

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA LUÍZA CIDRAL

**CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO 3'-UTR DO GENE *HLA-G*  
DE TRANSPLANTADOS RENAIIS COM REJEIÇÃO CLÍNICA**

CURITIBA

2017

ANA LUÍZA CIDRAL

**CARACTERIZAÇÃO DE POLIMORFISMOS NA REGIÃO 3'-UTR DO GENE *HLA-G*  
DE TRANSPLANTADOS RENAIIS COM REJEIÇÃO CLÍNICA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina TCC II como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel no Curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Bicalho  
Co-orientadora: MSc. Vanessa Hauer

CURITIBA

2017

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pelo apoio, amor e confiança. Por sempre terem acreditado em mim, sem medir esforços para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã Isabela, por ser minha inspiração e proporcionar momentos de leveza durante a correria desse ano. Apesar de tudo, você ainda é a irmã mais velha!

À Vanessa, por compartilhar as dores e alegrias durante a realização desse trabalho e por ter paciência comigo.

À professora Maria da Graça Bicalho, por ter me acolhido e aceitado ser minha orientadora neste importante período da minha vida.

Aos colegas do LIGH, em especial ao Samuel, pelas sugestões e auxílio nas análises.

Ao meu namorado Paulo, pelos momentos de distração e diversão, mas também pelo apoio, compreensão, paciência e abraços nas horas mais delicadas desse ano.

À tia Di, por sempre ter incentivado o estudo e a leitura, e por sempre dar um jeito de estar presente, mesmo longe.

## RESUMO

O gene *HLA-G* (*human leukocyte antigen-G*), juntamente com *HLA-E* e *HLA-F*, se destaca entre os genes de classe I não clássicos (Ib) que pertencem ao complexo principal de histocompatibilidade humano (do inglês; *major histocompatibility complex*) denominado *HLA* (*human leukocyte antigen*). Quando comparado aos genes *HLA* de classe I clássicos (Ia), distingue-se por apresentar um número menor de alelos. A molécula *HLA-G* foi primeiramente observada na interface materno-fetal, onde foi, também, descoberto o seu papel de imunotolerância. Enquanto em tumores o *HLA-G* atua promovendo o escape à imunovigilância, nos pacientes transplantados ele pode atuar como um imunossupressor natural favorecendo a aceitação do enxerto. Neste último caso, a baixa expressão de *HLA-G* tem sido associada a um risco maior de rejeição nos transplantes. O conhecimento sobre a regulação e função do *HLA-G* poderá contribuir para a compreensão sobre os mecanismos de imunotolerância e rejeição e resultar em maior taxa de sucesso em transplantes. A expressão de *HLA-G* pode ser alterada por diversos fatores ambientais, genéticos e epigenéticos, dentre os quais estão os polimorfismos de sequência única ou SNPs (*single nucleotide polymorphism*) na região 3'-UTR (*three prime untranslated region*), que podem interferir na estabilidade do RNAm, promovendo ou suprimindo a expressão da molécula. O presente trabalho caracterizou a região 3'-UTR de *HLA-G* com relação aos seus polimorfismos em grupos de transplantados renais que desenvolveram rejeição clínica e aqueles que se mantiveram saudáveis. O estudo comparou as frequências haplotípicas, alélicas e genotípicas dos polimorfismos, abrangendo estudos de desequilíbrio de ligação e aplicando um modelo de regressão logística binária para detectar polimorfismos associados ao desenvolvimento da rejeição. Dos mais de 40 haplótipos UTR já descritos na literatura, os grupos analisados neste estudo apresentaram 11. Nenhum dos haplótipos mostrou associação ao desenvolvimento da rejeição. Entretanto, os polimorfismos nas posições +3010 e +3142 apresentaram significância estatística. O homozigoto +3010G/G caracteriza um efeito protetivo contra o desenvolvimento da rejeição clínica, enquanto o heterozigoto +3010C/G é fator de risco. Além disso, o heterozigoto +3142C/G foi considerado fator de risco em uma das análises estatísticas. Por fim, o modelo de regressão logística binária demonstrou que o alto valor de PRA (acima de 30%) também é fator de risco para o desenvolvimento da rejeição clínica, o que está de acordo com resultados de outros trabalhos já publicados.

**Palavras-chave:** *HLA-G*; transplante renal; 3'-UTR; imunotolerância; polimorfismos

## ABSTRACT

The *HLA-G* (*human leukocyte antigen-G*) gene, along with *HLA-E* and *HLA-F*, stands out among the nonclassical class I genes (Ib) belonging to the human major histocompatibility complex, also called HLA. When compared to the classical class I genes (Ia), it is distinguished by its low number of alleles. The molecule HLA-G was first observed at the maternal-fetal interface, where its immunotolerance role was also discovered. While HLA-G acts on the promotion of the immunosurveillance escape in tumors, it can also act as a natural immunosuppressant on patients going through transplantation, favoring the graft acceptance. In the latter case, the low expression of *HLA-G* has been linked to a higher risk of graft rejection. The study of *HLA-G* expression and function may shed a light on the immunotolerance and rejection mechanisms and may also lead to an increase in the success rates of transplantation. The *HLA-G* expression can be regulated by environmental, genetic and epigenetic factors, including SNPs (single nucleotide polymorphisms) on the 3'-UTR (three prime untranslated region), which are able to affect the mRNA stability, promoting or inhibiting the molecule expression. The present study aimed to characterize the 3'-UTR portion of *HLA-G* regarding its polymorphisms in groups of kidney transplantation patients who developed clinical rejection and those who remained healthy. The study compared the haplotype, genotype and allele frequencies of the polymorphisms, encompassing linkage disequilibrium tests and a binary logistic regression model to detect polymorphisms that could be associated to the rejection development. Among over 40 UTR haplotypes described in the literature, the groups in this study presented 11. None of the haplotypes showed a clear association to the risk of rejection. However, the polymorphisms on positions +3010 and +3142 presented statistical significance. The +3010G/G genotype characterizes a protective factor against the development of rejection while the heterozygous genotype on this position is considered a risk factor. Besides, the heterozygous genotype on position +3142 also represents a risk factor according to one of the statistical analyses. Finally, the binary logistic regression model pointed the high value of PRA (higher than 30%) as a risk factor to the clinical rejection development, which is in agreement with results from other studies.

**Keywords:** *HLA-G*; kidney transplantation; 3'-UTR; immunotolerance; polymorphisms

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – VISÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO MHC DE CLASSE I E II.....	19
FIGURA 2 – AS DIFERENTES FUNÇÕES DE HLA-G SOBRE AS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE.....	29
FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS ISOFORMAS DE HLA-G E RESPECTIVOS TRANSCRITOS.....	31
FIGURA 4 – COMPARAÇÃO ENTRE O PROMOTOR DE <i>HLA-G</i> E DE OUTROS GENES <i>HLA</i> DE CLASSE I.....	32
FIGURA 5 – ESQUEMA DE POLIMORFISMOS ANALISADOS E REGIÕES DE HIBRIDIZAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	38
FIGURA 6 – TESTE DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR.....	42
FIGURA 7 – TESTE DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR COM GRADIENTE DE TEMPERATURAS DE HIBRIDIZAÇÃO.....	43
FIGURA 8 – TESTE DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR COM ALTERAÇÕES NOS VOLUMES DE REAGENTES.....	44
FIGURA 9 – FRAGMENTO DO ELETROFEROGRAMA RESULTANTE DA OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO.....	45
FIGURA 10 – APRESENTAÇÃO DOS GRUPOS PAREADOS DE ACORDO COM A IDADE DOS INDIVÍDUOS (INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%).....	47
FIGURA 11 – DADOS CLÍNICOS RELEVANTES AO RISCO DE REJEIÇÃO OBSERVADOS NOS PACIENTES.....	48
FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO OBSERVADO ENTRE OS SNPS ANALISADOS.....	53
FIGURA 13 – SÍTIOS DE LIGAÇÃO A MIRNAS NA REGIÃO 3'-UTR DO GENE <i>HLA-G</i> .....	58

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	–	CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO DE BANFF DA REJEIÇÃO NO TRANSPLANTE RENAL.....	23
TABELA 2	–	PROTOCOLO INICIAL PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR.....	39
TABELA 3	–	CICLAGEM DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR DE <i>HLA-G</i> .....	39
TABELA 4	–	CICLAGEM PARA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 3'-UTR DE <i>HLA-G</i> .....	41
TABELA 5	–	PROTOCOLO FINAL DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR DO GENE <i>HLA-G</i> .....	46
TABELA 6	–	PROTOCOLO FINAL DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 3'-UTR DO GENE <i>HLA-G</i> .....	46
TABELA 7	–	HAPLÓTIPOS UTR ENCONTRADOS NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	49
TABELA 8	–	FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS ENCONTRADAS NOS GRUPOS DO PRESENTE ESTUDO EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS ENCONTRADOS NA LITERATURA.....	50
TABELA 9	–	FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS RELATIVAS DISCRIMINADAS POR GRUPO.....	51
TABELA 10	–	FREQUÊNCIAS RELATIVAS DOS GENÓTIPOS ANALISADOS DISCRIMINADOS POR GRUPO E RESULTADO DO TESTE EXATO DE FISHER ENTRE O GRUPO NR E R.....	52
TABELA 11	–	VARIÁVEIS EVIDENCIADAS PELO MÉTODO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA BINÁRIA ASSOCIADAS A REJEIÇÃO CLÍNICA.....	54

## LISTA DE SIGLAS

3'-UTR	–	região 3' não traduzida
5'-URR	–	região 5' regulatória
APCs	–	células apresentadoras de antígeno
ATG	–	globulina anti-timocítica
AZA	–	azatioprina
DSA	–	anticorpos doador específicos
EXO1	–	exonuclease I
HLA	–	antígeno leucocitário humano
HLA-G	–	antígeno leucocitário humano-G
MHC	–	complexo principal de histocompatibilidade
miRNA	–	microRNA
NK	–	célula <i>natural killer</i>
OR	–	<i>odds ratio</i>
PAMPs	–	padrões moleculares associados a patógenos
PCR	–	reação em cadeia da polimerase
PRA	–	painel reativo de anticorpos
RNA <sub>m</sub>	–	RNA mensageiro
SAP	–	fosfatase alcalina de
SNP	–	polimorfismo de nucleotídeo único
TCR	–	receptor de célula T
Treg	–	célula T regulatória



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>13</b>
2.1 VISÃO GERAL DO TRANSPLANTE RENAL.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.1.1 Variáveis clínicas consideradas do pré ao pós-transplante .....	14
2.2 SISTEMA IMUNE .....	16
2.2.1 HLA.....	18
2.2.2 HLA e rejeição .....	20
2.3 Tolerância ao aloenxerto.....	24
2.3.1 Tolerância induzida via imunossupressão .....	24
2.3.2 Tolerância via mecanismos naturais.....	26
2.4 HLA-G .....	28
2.4.1 Imunotolerância .....	28
2.4.2 Estrutura do gene e proteína .....	30
2.4.3 Expressão.....	32
2.4.4 Polimorfismos do gene <i>HLA-G</i> .....	33
2.4.5 Variações na região 3'-UTR.....	34
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	36
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>37</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA .....	37
4.2 EXTRAÇÃO DE DNA.....	37
4.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR .....	37
4.3.1 Oligonucleotídeos .....	37
4.3.2 Otimização da PCR .....	38
4.4 ELETROFORESE .....	40
4.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR .....	40
4.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	40
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1 PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA .....	42
5.1.1 Amplificação da região 3'-UTR .....	42
5.1.2 Sequenciamento do produto de amplificação .....	44
5.2 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA NA POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	46
5.2.1 Caracterização da população em estudo.....	46

5.2.2 Caracterização da região 3'-UTR de <i>HLA-G</i> na população em estudo.....	49
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O principal procedimento adotado para pacientes com falência renal crônica é o transplante de rim. Embora seja amplamente realizado, esta técnica ainda possui limitações, sendo que a principal delas diz respeito à rejeição imunológica do órgão transplantado, que atualmente é controlada pela administração de imunossupressores (SCHOLD; SRINIVAS; KAPLAN, 2004). Entretanto, estes fármacos imunossupressores apresentam efeitos colaterais, majoritariamente pela redução da função do sistema imune de forma generalizada, levando, por exemplo, a quadros de infecção viral ou bacteriana, desenvolvimento de doenças secundárias, ao exemplo da hipertensão e câncer (TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005). Assim, é necessário que haja um equilíbrio da função do sistema imune, envolvendo a tolerância ao aloenxerto e manutenção da resposta imune natural contra patógenos.

O *HLA-G* (antígeno leucocitário humano-G, do inglês *human leukocyte antigen-G*) é um gene do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) que codifica moléculas de mesmo nome e apresenta papel importante na indução da imunotolerância, por ligar-se a receptores inibitórios em células do sistema imune (CAROSELLA et al., 2000). A participação da molécula *HLA-G* em mecanismos de tolerância foi descrita em transplantes, sendo que a elevada produção da sua isoforma solúvel é associada à aceitação do enxerto e a baixa produção relacionada à rejeição (LE ROND et al., 2006).

Uma característica peculiar do gene *HLA-G* é o reduzido número de polimorfismos na região codificadora, o que remete também a um baixo número de variantes proteicas. As variações mais numerosas desse gene se encontram nas regiões regulatórias 5'-URR (região 5' regulatória, do inglês *five prime regulatory region*) e 3'-UTR (região 3' não traduzida, do inglês *three prime untranslated region*) (ALEGRE et al., 2014). As variações nucleotídicas nessas regiões podem influenciar o nível de expressão da proteína *HLA-G* alterando mecanismos transcricionais e pós-transcricionais e, conseqüentemente, interferindo na resposta imune contra o aloenxerto.

As variantes da região 3'-UTR afetam principalmente os eventos pós-transcricionais, diminuindo a estabilidade do RNAm ou alterando a afinidade de

ligação de microRNAs pelo seu sítio de ligação na região 3'-UTR (CASTELLI et al., 2010). Assim, a investigação destes polimorfismos constitui uma interessante área a ser explorada para, no futuro, servir como base para alvos terapêuticos inovadores que sejam eficazes em estimular ou inibir a produção do HLA-G.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 VISÃO GERAL DO TRANSPLANTE RENAL

Dentre as inúmeras esferas de inovações científicas do século XX, a possibilidade concretizada de substituir um órgão não funcional por um funcional por meio dos transplantes esteve entre as mais revolucionárias. O aprimoramento da técnica, incorporada com sucesso pela primeira vez em 1954, por Joseph Murray, possibilitou a sobrevivência e melhora da qualidade de vida de muitos pacientes (AKTAŞ, 2014; RAO et al., 2015). Dentre os transplantes de órgãos sólidos mais realizados no Brasil e no mundo estão os renais, que também constituem o principal modelo de estudo.

No Brasil, no ano de 2016, foram realizados cerca de 5 mil transplantes de rim, porém, a lista de espera ainda é a maior, contendo 20.523 pacientes até junho de 2017, segundo a Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS, 2017).

A história do transplante renal teve vários casos de insucesso, culminando com frequência na remoção do órgão transplantado (FILIPPONE; FARBER, 2015). A principal causa desses resultados indesejados era a rejeição imunológica do órgão recebido pelo paciente, evento descrito pela primeira vez nos estudos de Peter Medawar em 1944. A primeira terapêutica, baseada no uso de corticosteroides, utilizada para controlar o evento da rejeição foi proveniente do mesmo tratamento adotado para doenças inflamatórias. Na mesma época foi desenvolvida a azatioprina (AZA). Em 1960, a AZA e os corticosteroides passaram a ser empregados em conjunto, tendo efeitos positivos em variados casos (NANKIVELL; ALEXANDER, 2010). Entretanto, esta imunossupressão era insuficiente, de forma que a rejeição continuou a ser o principal empecilho para um transplante renal de sucesso.

As novas pesquisas na área da imunologia, o aprimoramento das técnicas cirúrgicas, a alocação do órgão do doador ao receptor e o desenvolvimento de novos protocolos clínicos reduziram as rejeições pós-transplante relatadas até três meses após a cirurgia (rejeições hiperagudas e agudas) (NANKIVELL; ALEXANDER, 2010). A rejeição aguda geralmente ocorre nas primeiras semanas após o procedimento, e é controlada via análise de diversos fatores, como a compatibilidade imunológica de

moléculas HLA, aliada ao uso de um conjunto de imunossupressores. Entretanto, um problema ainda não resolvido diz respeito à rejeição crônica, que acontece meses depois do transplante e impacta o funcionamento do órgão. Desde 1960 até hoje, a taxa de sobrevivência do enxerto após 5 anos do transplante não sofreu alteração nenhuma, nem mesmo com os tratamentos imunossupressores (SCHOLD; SRINIVAS; KAPLAN, 2004). Dessa forma, o grande desafio no campo da imunologia é desvendar mecanismos que possibilitem a modulação da rejeição no paciente, diminuindo a intensidade da resposta imune contra o enxerto, porém mantendo a resposta imune saudável contra infecções e outros eventos. Logo, o encontro desse equilíbrio imunológico seria ideal para promover o aumento da sobrevivência do enxerto a longo prazo.

Quando um corpo estranho está presente no organismo mas não desencadeia respostas imunológicas de rejeição, diz-se que o sistema imune é tolerante àquele antígeno (PARKIN; COHEN, 2001). Assim, é desejável que o paciente receptor de um órgão transplantado seja imunotolerante a esse órgão, eliminando a possibilidade de rejeição. Com base nisso, pode-se observar que a rejeição e a tolerância são efeitos opostos desencadeados por diferentes respostas do sistema imune a um antígeno.

### 2.1.1 Variáveis clínicas consideradas do pré ao pós-transplante

Diversos fatores clínicos são avaliados previamente à realização do transplante e continuamente após o procedimento. As finalidades dessas avaliações se concentram em estabelecer uma classificação de risco de desenvolver rejeição e também avaliar a função do órgão e a saúde geral do receptor.

Quando se determina o risco de desenvolvimento de rejeição, pode-se, também, determinar qual a melhor terapia de imunossupressão para cada indivíduo, o que torna cada terapia única. A forma mais clássica de estabelecer o estado de risco imunológico do paciente é através do número de incompatibilidades dos genes *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-DR* entre doador e receptor. Assim, quanto maior o número de divergências, maior o risco de rejeição (KDIGO TRANSPLANT WORK GROUP, 2009).

Além das incompatibilidades HLA, também é avaliada a presença, no soro do receptor, de anticorpos específicos contra antígenos do doador (DSA, do inglês, *donor specific antibodies*). Uma das maneiras mais recentes e específicas para realizar esse teste é através do isolamento de moléculas HLA específicas do doador e ligação destas proteínas a microesferas (*beads*). Estes *beads* entram em contato com o soro do potencial receptor, que contém os anticorpos. Caso haja anticorpos específicos contra antígenos HLA do doador (DSAs), eles se ligarão aos *beads* e serão detectados por fluorescência (CARO-OLEAS et al., 2010). Indivíduos que possuem DSAs correm maior risco de rejeitar o enxerto (SIS et al., 2010).

Ainda, pode ser realizado um painel de reatividade a anticorpos (PRA, do inglês, *panel reactive antibodies*), que permite verificar a ligação de anticorpos presentes no soro do paciente receptor a diversos antígenos HLA, não necessariamente específicos de um doador. O resultado indica, em porcentagem, a quantidade de antígenos HLA testados neste painel aos quais os anticorpos do receptor se ligam (MISHRA; BALIGA, 2013). O risco de rejeição geralmente tem relação positiva com a porcentagem expressa no resultado (KDIGO TRANSPLANT WORK GROUP, 2009).

Outras variáveis que são consideradas dizem respeito à idade do receptor, sendo que pacientes mais jovens correm mais risco de sofrer rejeição (COLE et al., 2008); à obesidade mórbida e a gestações prévias, que são fatores de risco (PRATSCHKE et al., 2016).

Um aspecto que já foi muito discutido como possível fator de risco em relação a rejeição do enxerto é o tempo de isquemia fria. Entretanto, com o aprimoramento dos procedimentos de transplante, a ocorrência de casos com tempo longo de isquemia fria pode ser evitada. Outra variável que também deixou de ser significativa é o tipo de doador: anteriormente, órgãos provenientes de doadores vivos estavam relacionados à maior taxa de aceitação do enxerto, mas atualmente não há mais diferenças significativas entre transplantes de doadores vivos ou cadáveres (PRATSCHKE et al., 2016).

Após o procedimento, é necessário realizar o acompanhamento do paciente, avaliando a função do órgão transplantado e monitorando possíveis complicações. No transplante renal, deve-se atentar aos níveis de creatinina no soro e ocorrência de

hematúria e proteinúria, marcadores da função renal. Além disso, deve-se avaliar o efeito dos fármacos imunossupressores na contagem de células sanguíneas e função hepática, bem como monitorar a ocorrência de diabetes (NAESENS; ANGLICHEAU, 2017).

Algumas complicações de saúde podem ocorrer a partir do transplante e da terapia de imunossupressão, de forma que seus sinais devem ser acompanhados desde o período pré-transplante, como é o caso da hipertensão, hiperlipidemia, diabetes e doenças cardiovasculares. Outras delas podem ocorrer como consequência direta do transplante e imunossupressão, como desenvolvimento de tumores, infecções, enfraquecimento dos ossos (calcemia), distúrbios hematológicos (anemias), diabetes pós-transplante e nefropatias (PADIYAR; AKOUM; HRICIK, 2008; SALIFU; TEDLA; MARKELL, 2005).

## 2.2 SISTEMA IMUNE

O sistema imune é uma organização complexa de células e compostos solúveis que tem como principal função a defesa contra corpos estranhos e organismos patogênicos. Este sistema pode ser identificado por dois tipos, que diferem com base, principalmente, na rapidez e especificidade da resposta (WARRINGTON et al., 2011).

A primeira é a resposta imune inata, que engloba componentes que reagem imediatamente à exposição a um antígeno (CHAPLIN, 2010). Nesta resposta, não há especificidade com relação aos antígenos. O que ocorre é o reconhecimento de moléculas estranhas ou antígenos que possuem um padrão compartilhado por diversos organismos. Assim, qualquer um desses organismos, se presente no hospedeiro, é identificado pelos padrões moleculares chamado *pathogen-associated molecular patterns*, ou PAMPs. Essas moléculas são ligantes de receptores como os da classe *Toll-like*. A ativação desses receptores pelos PAMPs desencadeia respostas que incluem a produção de citocinas, moléculas envolvidas na comunicação parácrina, e também o recrutamento de leucócitos para o sítio onde a molécula foi detectada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014; PARKIN; COHEN, 2001). Dentre as funções das citocinas estão os estímulos à fagocitose do agente invasor por células



do sistema imune, como macrófagos e células dendríticas. A produção de citocinas também leva a outros efeitos imunológicos e fisiológicos como a inflamação. Todos esses efeitos têm como objetivo a eliminação do organismo invasor ou, no caso dos transplantes, do aloenxerto (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014; MCINTIRE; HUNT, 2005).

A resposta imune adaptativa é outra forma de reconhecimento de antígenos, e apesar de ser tardia, é mais específica e forte. As principais células efetoras envolvidas neste tipo de resposta são os linfócitos T e B, responsáveis pela rejeição celular e humoral, respectivamente (WARRINGTON et al., 2011).

Na imunidade celular, as células T comandam diversos mecanismos. Estes linfócitos possuem o receptor de célula T (TCR, do inglês *T-cell receptor*), que identifica antígenos com alta especificidade. Isto decorre do mecanismo de produção desses receptores. O sítio de ligação do TCR é distinto em cada clone de células T. Esta peculiaridade é determinada pelo mecanismo de recombinação somática, ou seja, o rearranjo genético que ocorre no DNA da célula precursora do linfócito T, nos éxons que codificam o sítio de reconhecimento do antígeno do TCR. Dessa forma, cada receptor, e, conseqüentemente, cada linhagem celular é única para um determinado antígeno. Se a célula portadora de um TCR específico nunca entrou em contato com o seu antígeno, ela é chamada de imatura ou *naïve*, pois nunca foi ativada (BONILLA; OETTGEN, 2010).

Para que esta célula T seja ativada, seu TCR deve entrar em contato com o antígeno. Existe um mecanismo definido de como esse encontro deve acontecer. Quando se trata da ativação de linfócitos T CD4+, células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês *antigen presenting cells*) digerem o invasor via fagocitose e, após processá-lo, exibem na fenda peptídica das moléculas HLA de classe II os peptídeos resultantes da clivagem das proteínas, para que possam ser reconhecidos pelos linfócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

Essa exposição de antígenos (peptídeos) acontece, também, por quaisquer células nucleadas do corpo que tenham sido invadidas por vírus ou se apresentem em processo de tumorigênese, quando não imunossuprimidas. Nessas condições específicas, linfócitos T CD8+ serão o alvo da ativação (WARRINGTON et al., 2011).

### 2.2.1 HLA

O sistema *HLA* (antígeno leucocitário humano, do inglês *human leukocyte antigen*) constitui o conjunto de genes codificadores presentes no complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) em humanos. Este sistema está localizado no braço curto do cromossomo 6 e inclui genes codificadores de HLAs de classe I e classe II, ambos envolvidos na resposta imune, e separados em clássicos e não clássicos. A diversidade dos genes *HLA* é a maior já identificada na espécie humana, o que se reflete também na alta especificidade e variabilidade observada nos mecanismos imunes adaptativos, como a rejeição celular e humoral nos transplantes. A maioria dos genes do sistema HLA estão relacionados à função imune. O termo HLA deve-se à identificação inicial destas moléculas na superfície de leucócitos (CHOO, 2007).

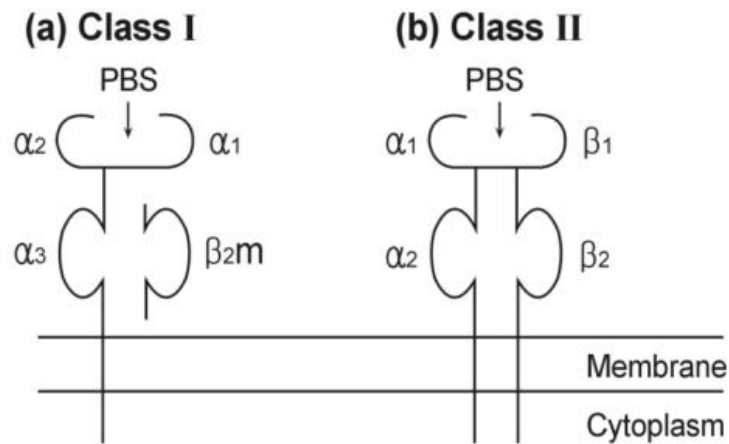
As moléculas HLA de classe I e II diferem em vários aspectos, mas tem como principal função a apresentação de antígenos (NEEFJES et al., 2011).

As moléculas HLA de classe I consistem em uma cadeia pesada (com domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ) glicosilada associada à  $\beta 2$ -microglobulina na sua porção extracelular (figura 1). A principal função é a apresentação de antígenos provenientes da própria célula. O peptídeo antigênico intracelular é apresentado ligado aos domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , constituintes da fenda peptídica do HLA, enquanto o domínio  $\alpha 3$  se liga à  $\beta 2$ -microglobulina. Entre os genes *HLA* de classe I clássicos estão *HLA-A*, *-B* e *-C*.

As moléculas HLA de classe II são heterodímeros de cadeias glicosiladas ligadas não covalentemente. As cadeias são formadas por domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ , de mesma estrutura básica. O antígeno apresentado é ligado aos domínios  $\alpha 1$  e  $\beta 1$ , correspondentes à fenda peptídica (figura 1).

Além dos genes *HLA*, o MHC contém, em sua região denominada de classe III, genes codificadores de outras moléculas com função imune, como citocinas e fatores do sistema complemento (CHOO, 2007).

FIGURA 1 – VISÃO ESQUEMÁTICA DA ESTRUTURA DO MHC DE CLASSE I E II



Fonte: CHOO, 2007

Legenda: PBS – sítio de ligação ao peptídeo (do inglês, *peptide binding site*)

A especificidade proveniente da diversidade genética observada para os genes *HLA* torna mais difícil o alcance da compatibilidade entre doador e receptor do enxerto. A existência de incompatibilidades nas moléculas HLA faz com que estas passem a ser identificadas como antígenos pelo sistema imune do receptor. Assim, os peptídeos resultantes do processamento das moléculas HLA imunogênicas pela via exógena nas APCs do doador são carregados em moléculas HLA de classe II, a serem exibidas na superfície de APCs. Quando um linfócito T do paciente realiza o reconhecimento específico da molécula HLA associada ao peptídeo, ocorre a ativação desta célula (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

Já no caso das moléculas HLA de classe I, ocorre o mecanismo de exposição de peptídeos próprios da célula, sem necessidade de fagocitose e processamento. Este é um fenômeno útil para exibição e reconhecimento de proteínas virais produzidas em uma célula infectada. Esta via de apresentação de antígenos HLA de classe I é dependente de proteassoma e da degradação natural de proteínas celulares (NEEFJES et al., 2011).

É possível perceber que a resposta imune é extremamente relacionada à funcionalidade das moléculas HLA, inclusive em situações onde um transplante é imunologicamente rejeitado pelo receptor (KONVALINKA; TINCKAM, 2015). Assim, quanto maior a similaridade entre genes *HLA* no doador e receptor, menor é a

possibilidade do sistema imune do paciente receptor detectar diferenças, fato associado à maior sobrevida do enxerto (CHINEN; BUCKLEY, 1967; NANKIVELL; ALEXANDER, 2010).

### 2.2.2 HLA e rejeição

Na hipótese de rejeição de um órgão transplantado, o mecanismo imunológico subjacente é mediado principalmente por anticorpos, no caso da rejeição humoral, ou por células T, no caso da rejeição celular.

Anticorpos podem originar rejeição por terem como alvo, principalmente, moléculas HLA não idênticas presentes em células do doador, antígenos de células endoteliais e antígenos do sistema ABO. As moléculas HLA são consideradas os principais aloantígenos por serem altamente polimórficas e amplamente expressas nos tecidos (LAKKIS; LECHLER, 2013). Os anticorpos anti-HLA pré-formados, ou DSAs (anticorpos doador específicos, do inglês *donor specific antibodies*) no paciente receptor, caso presentes, são resultado de uma sensibilização prévia a esses antígenos (CHOO, 2007).

Quando a rejeição ocorre imediatamente após o transplante, ela é classificada como hiperaguda, e geralmente reflete a deposição de anticorpos anti-ABO, caso os tipos sanguíneos do doador e receptor não sejam compatíveis, mas, principalmente, contra o HLA não-idêntico do doador, exposto na microvasculatura do aloenxerto (KIM et al., 2014). Nesses casos, se desenvolve a necrose e o enxerto deve ser removido via transplantectomia. Geralmente, a rejeição hiperaguda ocorre em casos onde o receptor tenha sido sensibilizado previamente contra os antígenos, o que pode acontecer devido a transplantes prévios, gravidez ou transfusão de sangue (NANKIVELL; ALEXANDER, 2010). A nova exposição, a partir do enxerto, leva à produção de anticorpos *de novo* que fixam complemento, e resultam em inflamação e disfunção do órgão (TERASAKI, 2003). O método de prevenção atualmente utilizado contra esse tipo de rejeição é a análise de DSAs pré-formados no receptor antes do transplante, verificando a presença de anticorpos imunogênicos e que possam produzir danos ao órgão transplantado (CHOO, 2007).

A rejeição chamada de aguda pode ser mediada por células e anticorpos e ocorre de dias a semanas após o procedimento. Seu início se dá após o tempo necessário para a produção de anticorpos e formação de células T alorreativas. Os anticorpos geralmente são direcionados ao HLA do doador, presentes nas células endoteliais. Quando se ligam, os anticorpos estimulam a fixação de complemento e recrutamento de leucócitos, levando a inflamação e disfunção do órgão (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

Entretanto, a forma mais comum de rejeição aguda é a celular, que é mediada por células T, às quais as APCs apresentam aloantígenos (LARSEN; MORRIS; AUSTYN, 1990). Aloantígenos são antígenos provenientes de um indivíduo da mesma espécie, mas que são reconhecidas como não próprias e são capazes de desencadear resposta imune.

O evento anteriormente descrito decorre das diferenças entre as moléculas HLA que se expressam nas células do doador e do receptor, o que pode levar à produção de respostas imunes agressivas. De 1 a 10% das células T do paciente receptor podem ser ativadas após o transplante, sendo que grande parte delas têm sua ativação desencadeada por antígenos HLA do doador (SUCHIN et al., 2017).

As células T podem ser ativadas direta ou indiretamente. Na ativação direta, as APCs do doador desencadeiam a ativação dos linfócitos T do receptor, sendo que não há necessidade de fagocitose, pois os peptídeos não próprios já estão sendo exibidos na superfície celular das APCs do doador. Os peptídeos, nesse caso, são provenientes do doador e são exibidos pelas próprias moléculas HLA do doador, que também são reconhecidas como não próprias. Isso acontece por causa da reatividade cruzada dos TCRs, que ligam o complexo formado pelo HLA próprio mais peptídeo não-próprio e complexos de HLA não-próprios mais peptídeo derivado de proteína endógena (LAKKIS; LECHLER, 2013; LIN; GILL, 2015).

Na ativação indireta, são as APCs do receptor que ativam os linfócitos T. Esse mecanismo é o mesmo envolvido na resposta imune contra patógenos, onde há fagocitose das células invasoras e processamento das proteínas que são exibidos na superfície celular das APCs do receptor, resultando em pequenos peptídeos. No caso específico do transplante, proteínas HLA do doador são endocitadas, processadas e seus peptídeos resultantes são apresentados à semelhança de uma proteína de um

micro-organismo, pelas moléculas HLA presentes nas APCs do receptor (LIN; GILL, 2015).

Por fim, a rejeição crônica se desenvolve silenciosamente durante meses e está associada a diferentes mudanças patológicas, majoritariamente mudanças vasculares como oclusão arterial. Os mecanismos prováveis são a ativação de células T alorreativas e produção de citocinas que estimulam a proliferação de células vasculares, obstruindo os vasos e levando à perda de função do enxerto (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014).

#### 2.2.2.1 Classificação de Banff

Com relação exclusivamente ao transplante renal, existe uma classificação distinta para os tipos de rejeição. Esta classificação foi proposta devido à grande heterogeneidade de achados entre os nefrologistas, de forma que se tornou necessário padronizar a caracterização dos tipos de rejeição (BHOWMIK et al., 2010). Hoje, há seis categorias na chamada Classificação de Banff, que utiliza critérios histopatológicos para determinar se as rejeições são mediadas por anticorpos ou por células T, bem como se existe um aspecto agudo ou crônico. Além disso, essa classificação também conta com as categorias chamadas de alterações *borderline* e fibrose intersticial com atrofia tubular, que se apresentam como outras mudanças histopatológicas ligadas à rejeição (LOUPY et al., 2017). A tabela 1 apresenta a lista completa das categorias e seus critérios para classificação.

TABELA 1 – CRITÉRIOS PARA CLASSIFICAÇÃO DE BANFF DA REJEIÇÃO NO TRANSPLANTE RENAL

<b>Categoria</b>	<b>Subtipos</b>	<b>Achados histopatológicos</b>
<b>1. Normal</b>		Nenhuma alteração histopatológica.
<b>2. Alterações mediadas por anticorpos</b>	Aguda do Tipo 1	Necrose tubular aguda (NTA), C4d positivo e mínima inflamação.
	Aguda do Tipo 2	Glomerulite e C4d positivo.
	Aguda do Tipo 3	Inflamação arterial transmural, alterações fibrinoides e C4d positivo.
	Crônica	Duplo contorno glomerular OU múltiplas camadas da membrana basal dos capilares peritubulares OU fibrose intersticial/atrofia tubular OU espessamento intimal das artérias e C4d positivo.
<b>3. Alterações <i>borderline</i></b>		Tubulites focais sem arterite intimal.
<b>4. Alterações mediadas por células T</b>	Aguda do tipo IA	Inflamação intersticial significativa e tubulite focal moderada.
	Aguda do tipo IB	Inflamação intersticial significativa e tubulite acentuada.
	Aguda do tipo IIA	Arterite discreta a moderada.
	Aguda do tipo IIB	Arterite acentuada associada a mais de 25% de perda da área luminal.
	Aguda do tipo III	Arterite transmural OU alterações fibrinoides e necrose da camada muscular lisa associada a inflamação linfocítica do vaso.
<b>5. Fibrose intersticial e atrofia tubular sem evidência de etiologia específica</b>	Grau I	Fibrose intersticial discreta e atrofia tubular.
	Grau II	Fibrose intersticial moderada e atrofia tubular.
	Grau III	Fibrose intersticial acentuada e atrofia tubular.
<b>6. Outros (não resultantes de rejeição aguda ou crônica)</b>		Alterações secundárias à hipertensão arterial crônica, toxicidade por inibidores de calcineurina, obstrução crônica e infecções virais.

Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2010; Sis *et al*, 2010.

## 2.3 Tolerância ao aloenxerto

É possível observar que o papel do HLA é extremamente importante no desenvolvimento das respostas imunes supracitadas, e indivíduos que recebem transplantes de doadores com HLA compatível possuem mais chances de sucesso na recuperação (CHOO, 2007). Porém, além do papel de mediador da rejeição, alguns genes *HLA* de classe I não clássicos também atuam desencadeando mecanismos de tolerância ou aceitação do enxerto. Ainda assim, o principal caminho para se alcançar a aceitação do órgão transplantado é a terapia de imunossupressão, que será discutida previamente aos mecanismos naturais de tolerância envolvendo genes *HLA*.

### 2.3.1 Tolerância induzida via imunossupressão

A terapia de imunossupressão aplicada a pacientes transplantados renais se divide em duas fases. A primeira delas é chamada de terapia de indução, e se refere aos fármacos imunossupressores utilizados no período transoperatório, até aproximadamente 7 ou 10 dias após o transplante. A sua principal função é a de reduzir a resposta imune contra o enxerto no momento da apresentação dos aloantígenos. Este objetivo é alcançado através da depleção de linfócitos T ou modulação da sua função imune. Como consequência, o risco de rejeição aguda é diminuído, bem como a necessidade de uso futuro de mais imunossupressores (KDIGO TRANSPLANT WORK GROUP, 2009).

Existem duas classes de fármacos utilizadas exclusivamente nesse período, chamadas de agentes de depleção de linfócitos e antagonistas do receptor de interleucina-2 (IL-2). No primeiro grupo estão a globulina anti-timocítica (ATG), globulina anti-linfocítica (ALG) e o anticorpo monomurab-CD3. No segundo grupo se encontram os anticorpos monoclonais daclizumab e basiliximab. Existem diferenças nas recomendações de tratamento de acordo com o risco de rejeição de cada paciente, mas, no Brasil, é preconizado o uso da globulina anti-timocítica na terapia de indução, juntamente com outros imunossupressores clássicos (KDIGO TRANSPLANT WORK GROUP, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).



Alguns dos efeitos colaterais da ATG são: febre, principalmente na aplicação da primeira dose; *rash* cutâneo; prurido; trombocitopenia e choque anafilático (raro) (TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005).

A segunda fase da terapia imunossupressora é conhecida como terapia de manutenção, e tem como objetivo diminuir o risco de rejeição, bem como proteger a função do enxerto. Nesta fase, são utilizados fármacos imunossupressores clássicos em combinação, de forma a alcançar imunossupressão suficiente e diminuir os efeitos tóxicos individuais de cada medicamento.

A classe de fármacos corticosteroides é, historicamente, muito usada para terapia de manutenção em transplantados. Isso se deve às suas propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias, que incluem a regulação negativa da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias. Efeitos colaterais do uso desses fármacos incluem alterações no metabolismo de carboidratos e lipídeos e perda de proteínas musculares, caracterizando o fenótipo da síndrome de Cushing (KDIGO TRANSPLANT WORK GROUP, 2009; TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005). No Brasil, o corticosteroide de escolha para imunossupressão é a prednisona (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Outra classe de fármacos imunossupressores clássicos usada na terapia de manutenção contém os inibidores de calcineurina, principalmente tacrolimo e ciclosporina. A calcineurina está presente na via de sinalização iniciada pela ativação do receptor de célula T e que culmina na expressão de citocinas pró-inflamatórias características da resposta imune. Assim, sua inibição bloqueia a continuidade da cascata, impedindo a produção de fatores essenciais para rejeição do enxerto. Efeitos colaterais importantes dessa classe são a nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hipertensão, diabetogênese, hipertricose ou alopecia, dentre outros (EIDELMAN et al., 1991; MATTOS; OLYAEI; BENNETT, 2000; TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005). Tanto a ciclosporina como o tacrolimo são utilizados no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

A azatioprina é outro fármaco utilizado na imunossupressão de manutenção. Seus metabólitos podem ser incorporados ao DNA replicante e impedir a continuidade da replicação e da proliferação celular de linfócitos. Seus principais efeitos colaterais são toxicidade hepática e supressão da medula óssea. No Brasil, a azatioprina é

altamente usada, mas em caso de intolerância, pode ser substituída pelo micofenolato de mofetila (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005).

O micofenolato de mofetila também atua na inibição da proliferação de linfócitos, sendo que essa função se deve à inibição de uma enzima necessária para síntese de guanosina, que, por sua vez, é essencial para a síntese de DNA. Seus principais efeitos colaterais são gastrointestinais, além de supressão da medula óssea e maior risco de infecções virais em comparação com a azatioprina (SOLLINGER, 2004).

Por fim, a última classe de drogas utilizada na terapia de manutenção inclui os fármacos everolimo e sirolimo. Estes exercem sua função imunossupressora por bloquearem a via de sinalização da mTOR, importante para a comunicação intercelular e progressão do ciclo celular, de forma que sua inibição impede que os linfócitos T passem da fase G1 para S do ciclo. Os efeitos colaterais mais comuns dessa classe de medicamentos são aumento do colesterol e triglicérides no soro do paciente, redução na contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, dentre outros (TAYLOR; WATSON; BRADLEY, 2005). No Brasil, recomenda-se o uso de fármacos desta classe apenas em condições específicas, nas quais outras drogas não podem ser utilizadas.

Em nosso país, as combinações mais aplicadas de imunossupressores na terapia de manutenção são: prednisona, azatioprina e ciclosporina/tacrolimo, ou também prednisona, micofenolato de mofetila (ou de sódio) e ciclosporina/tacrolimo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

### 2.3.2 Tolerância via mecanismos naturais

O tópico anterior tratou dos mecanismos induzidos por terapia farmacológica para se chegar à tolerância e imunossupressão. Entretanto, muitos mecanismos naturais diferentes podem traçar um caminho similar e reduzir a resposta imune em busca da tolerância, principalmente em relação a antígenos próprios.

No início do desenvolvimento do sistema imune, as células precursoras de linfócitos T passam pela seleção negativa no timo. Esse mecanismo é chamado de

tolerância central e leva à eliminação de clones de linfócitos T auto-reativos ou com potencial de alta reatividade por componentes próprios, incluindo as proteínas codificadas pelos genes *HLA* (GRIESEMER; SORENSON; HARDY, 2010).

Já os mecanismos de tolerância periférica ocorrem em células T já diferenciadas em CD4+ ou CD8+ que possuem certa afinidade pelo HLA. Uma das vias envolvidas é da Fas/FasL, que também leva à deleção clonal das células auto-reativas (MUELLER, 2009).

Para que as células T sejam ativadas, além da ligação do TCR também é necessária a ligação de um sinal coestimulatório. Assim, caso este sinal não esteja presente, mesmo com a ligação do TCR, os linfócitos T não serão ativados e entrarão em um estado de anergia, onde não são responsivos e geram parte da tolerância.

Outras formas de tolerância conhecidas envolvem a participação de moléculas inibitórias em vias de sinalização. Algumas delas são o CTLA-4, PD-1/PD-L1 e CD40/CD40L, que, por vias diferentes, podem inibir a ativação e proliferação de células T (ALPDOGAN; VAN DEN BRINK, 2012).

Por fim, há também células T regulatórias ou células Treg, que têm sido as mais estudadas e que também são funcionalmente suprimidas pelo uso das atuais drogas imunossupressoras. Sua principal função é a supressão das respostas imunes, e a sua ausência desencadeia respostas autoimunes no organismo. Estas células não respondem a estímulos no TCR (são anérgicas) e expressam o fator de transcrição Foxp3, principal responsável pelas funções imunes (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003). As células Treg suprimem a proliferação de linfócitos T CD4+ e T CD8+ com o auxílio da citocina IL-2, necessária para a função ótima das células regulatórias (FURTADO et al., 2002). Há, ainda, muitas interconexões entre as células e moléculas regulatórias da função imune (ALPDOGAN; VAN DEN BRINK, 2012).

Estes são os principais mecanismos naturais de tolerância conhecidos; entretanto, outra molécula vem tomando um espaço cada vez maior no estudo da regulação da resposta imune em meio aos mecanismos imunológicos já citados: o HLA-G.

## 2.4 HLA-G

O *HLA-G* é mais um dos genes presentes no complexo principal de histocompatibilidade, e pertence ao grupamento gênico dos HLAs de classe I não clássicos. Este termo faz referência a diferentes características do HLA-G em relação às principais moléculas HLA de classe I. Essas discrepâncias incluem a baixa diversidade alélica de *HLA-G*, a distribuição restrita da proteína expressa a tecidos específicos e sua função imunomoduladora (CAROSELLA et al., 2014).

### 2.4.1 Imunotolerância

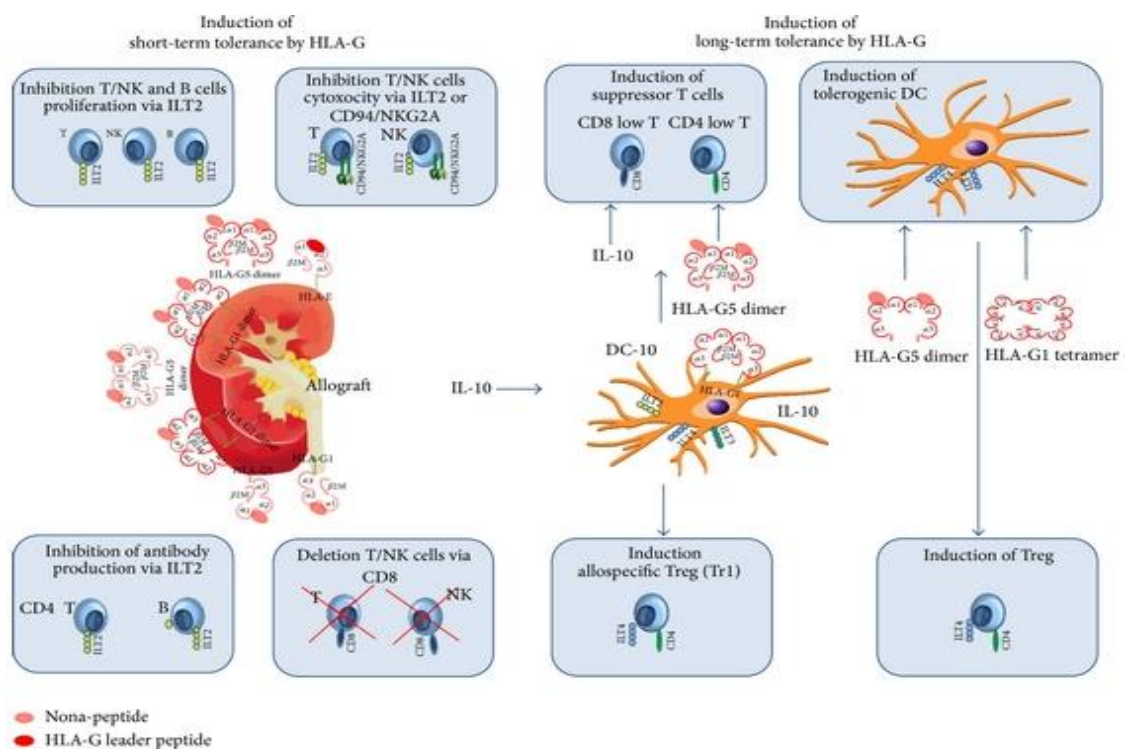
A restrição tecidual de HLA-G está altamente relacionada à função da molécula. A principal região onde ela está expressa é a interface materno-fetal, onde os citotrofoblastos expõem a molécula HLA-G perante a decídua em períodos específicos da gestação (BERNARDS et al., 1989). Na decídua materna, a presença do HLA-G e sua interação com receptores presentes nas células NK, ali presentes em grandes quantidades, parece ser um dos principais mecanismos da indução da tolerância materno-fetal e é necessária para a implantação do embrião. Estudos demonstram que o feto protege-se da rejeição através de uma camada de células que não possuem HLA-A ou HLA-B. Para evitar a destruição dessa camada, os trofoblastos expressam HLA-G, que, por seu baixo nível de variações, interage com diversos receptores inibitórios de células NK, deslocando o balanço em direção à inibição da função dessas células (ROUAS-FREISS et al., 1997). Alterações na expressão desta molécula podem culminar em complicações gestacionais como pré-eclâmpsia e aborto recorrente (MORANDI et al., 2016).

A partir desses dados, sugeriu-se que a função do HLA-G está fortemente associada à imunotolerância, com o objetivo de preservar o feto e impedir que o sistema imune materno o expulse. Entretanto, além da presença da molécula na gestação, ela também foi detectada em estados patológicos como o câncer e em pacientes transplantados, nos quais também exerce função na inibição da resposta imune (REBMANN et al., 2014).

A tolerância mediada por HLA-G é alcançada através de inúmeros mecanismos em várias células do sistema imune que apresentam receptores para esta molécula. Os principais receptores que se ligam ao HLA-G são LILRB1, LILRB2 e KIR2DL4, sendo que os dois primeiros apresentam função inibitória estabelecida, enquanto o último ainda vem sendo estudado com maior cautela, pois possui, também, função ativadora (CAROSELLA et al., 2000).

A supressão da resposta imune desencadeada por HLA-G envolve a inibição da função citolítica das células NK, da função citolítica de linfócitos T citotóxicos, da resposta aloproliferativa dos linfócitos T auxiliares, da proliferação de células NK e linfócitos T e da função de apresentação de antígenos de células dendríticas através dos diferentes receptores (CAROSELLA et al., 2014). Algumas das funções tolerogênicas do HLA-G estão demonstradas abaixo (figura 2). Além disso, por apresentar baixo nível de polimorfismos na sua região codificadora, o HLA-G não é capaz de desencadear respostas alôgenas e, pelo mesmo motivo, é capaz de ativar vários receptores inibitórios diferentes (CAROSELLA et al., 2014; HVIID et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 1997). Ainda, sua função de apresentação de antígenos é restrita a peptídeos próprios (CASTELLI et al., 2017).

FIGURA 2 – FUNÇÕES DE HLA-G SOBRE AS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE



Fonte: REBMANN et al., 2014.

Dessa forma, a presença de HLA-G em células tumorais está associada a um mau prognóstico, pois vem acompanhada da inibição da resposta imune contra o tumor, ou o chamado escape da imunovigilância (PAUL et al., 1998). Isso significa que o HLA-G está impedindo a ação do sistema imune contra o câncer.

Já a presença da proteína HLA-G no soro de pacientes transplantados tem sido associada à maior chance de sobrevivência do aloenxerto (LE ROND et al., 2006; QIU et al., 2006). Isto decorre da inibição da resposta imune agressiva que provoca a rejeição do transplante, como visto anteriormente. Da mesma forma, a presença de HLA-G na superfície de células T regulatórias é positiva para a sobrevivência do aloenxerto, assim, esta molécula pode servir como um indicador preditivo para o prognóstico e para resposta dos pacientes ao tratamento farmacológico (BAŞTÜRK et al., 2006).

No que se refere a genótipos *HLA-G*, sugere-se que a maior ocorrência de rejeição ao aloenxerto é observada quando os indivíduos são heterozigotos que apresentam um dos alelos com mutação sinônima e o outro com mutação não-sinônima (PIRRI et al., 2009).

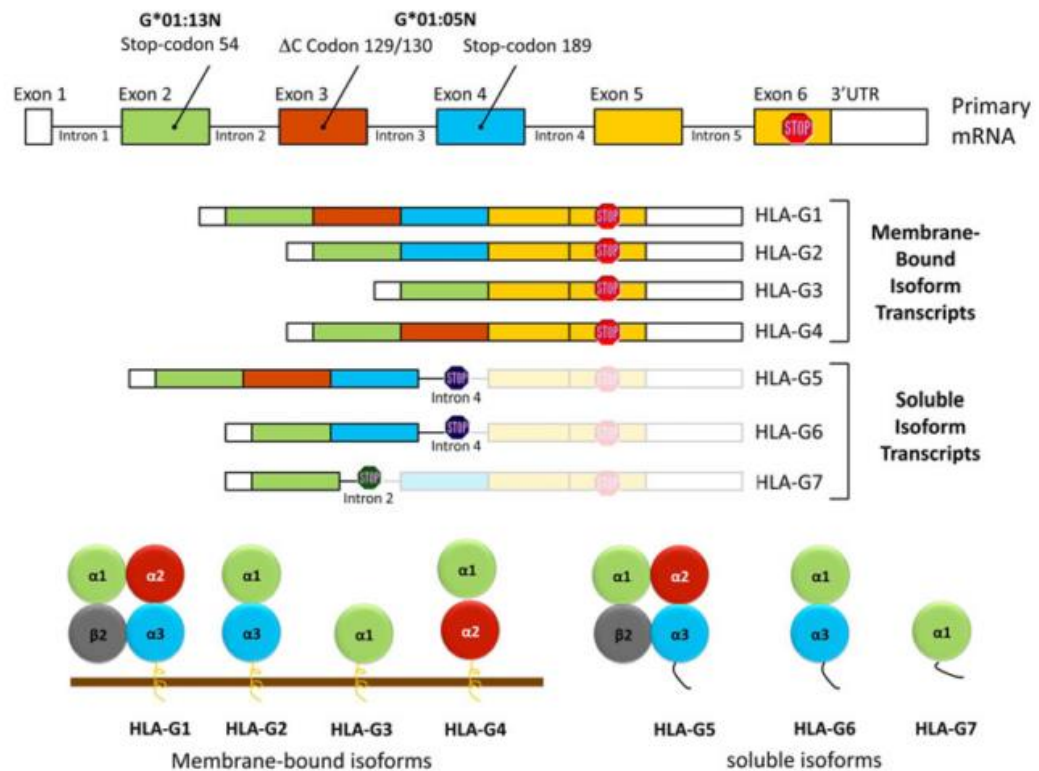
#### 2.4.2 Estrutura do gene e proteína

De acordo com a plataforma IMGT, o gene *HLA-G* se estende por 4.159 pares de base na região genômica onde situa-se o MHC humano (ROBINSON et al., 2015). O primeiro RNA mensageiro transcrito do gene *HLA-G* passa por processamento alternativo e origina até 7 transcritos diferentes, que codificam 7 isoformas proteicas. Dentre elas, 4 são moléculas expressas ligadas à membrana celular (HLA-G1 a HLA-G4) e 3 são isoformas solúveis (HLA-G5 a HLA-G7) (CAROSELLA et al., 2014; ISHITANI; GERAGHTY, 1992).

As proteínas HLA-G1 e HLA-G5 compreendem os transcritos completos e mais expressos, sendo, por esse motivo, as moléculas mais estudadas. A isoforma completa é constituída por 3 domínios globulares ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ ), ligados não covalentemente entre si e à  $\beta 2$ -microglobulina, além da porção transmembrana e da cauda citoplasmática mais curta que os HLAs clássicos (MORANDI et al., 2016) (figura

3). As outras isoformas são menores pois não apresentam todos os domínios globulares. Além disso, as moléculas de HLA-G podem estar presentes na forma de dímeros e trímeros, as quais possuem maior afinidade pelos receptores se comparadas aos monômeros. Ademais, o HLA-G1 ligado à membrana celular pode sofrer clivagem proteolítica por metaloproteinases, resultando na isoforma solúvel, sHLA-G1 (CAROSELLA et al., 2014).

FIGURA 3 – DESENHO ESQUEMÁTICO DAS ISOFORMAS DE HLA-G E RESPECTIVOS TRANSCRITOS



Fonte: DONADI et al., 2011.

O gene *HLA-G* consiste em região promotora dividida em distal e proximal, região codificadora composta por 6 éxons e 5 íntrons, sendo que o primeiro éxon codifica o peptídeo sinal, e ao final do último éxon se inicia a região 3'-UTR (ROBINSON et al., 2015). No banco de dados IMGT/HLA estão registrados 56 alelos, que codificam 20 proteínas HLA-G, duas delas truncadas (CASTELLI et al., 2014). É importante lembrar que a molécula HLA-G1 corresponde ao transcrito primário completo, assim, ela é a referência para o estudo dos alelos *HLA-G*.





elemento responsivo a AMP cíclico (CRE) e elemento responsivo à ligação de Ras (RREB1) (CASTELLI et al., 2014). Como essa região apresenta inúmeros fatores regulatórios, a variação nucleotídica nesses sítios pode influenciar a ligação dos fatores, bem como a expressão de HLA-G (TURECK et al., 2013).

Já a taxa de degradação do RNA mensageiro de HLA-G pode ser controlada através da região 3'-UTR desse gene. Esta região gênica é capaz de alterar a expressão de HLA-G por alguns mecanismos que serão vistos mais à frente, de forma que variações nessa porção do gene também podem alterar a expressão final da proteína (LAZARTE et al., 2015).

#### 2.4.4 Polimorfismos do gene *HLA-G*

A maioria das variações no gene *HLA-G* são SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês *single nucleotide polymorphisms*), que se concentram nas regiões promotoras e 3'-UTR, enquanto a região codificadora é altamente conservada. Além disso, as variações existentes na região codificadora são, em sua maioria, intrônicas e sinônimas (CASTELLI et al., 2017). Estas mutações, portanto, não alteram a estrutura molecular de HLA-G, mas as alterações nas regiões regulatórias têm sido associadas a diferenças nos níveis de expressão desta proteína (VAN DER VEN; PFEIFFER; SKRABLIN, 2000). As duas únicas alterações que levam à perda funcional da proteína são definidas pelos alelos *HLA-G\*01:05N* e *HLA-G\*01:13N*. No primeiro, a deleção de um nucleotídeo altera a matriz de leitura do gene, dando origem a um códon de parada prematuro. No segundo caso, uma mutação de ponto produz, também, um códon de parada prematuro (LARSEN; HVIID, 2009).

A região não-codificante 5'-URR contém polimorfismos relevantes à expressão gênica, pois inclui o sítio promotor e elementos regulatórios *cis*. Um dos estudos revelou um aumento na expressão de HLA-G quando uma guanina (G) estava presente na posição -725 ao invés de citosina (C) ou timina (T) (OBER et al., 2003).

Os polimorfismos do gene *HLA-G* apresentam grande desequilíbrio de ligação, de forma que é comum a análise de variações por meio de haplótipos. No total, segundo um estudo publicado em 2017 realizado com indivíduos do Brasil e

Chipre, observam-se 120 variações incluindo a região 5'-UTR, codificadora e 3'-UTR, totalizando 58 haplótipos estendidos envolvendo todos esses sítios (CASTELLI et al., 2017). O Brasil é a região com a maior variabilidade já detectada de HLA-G, sendo ideal para o estudo das variações nucleotídicas (CASTELLI et al., 2010).

Apesar de apresentar grande variabilidade, há duas linhagens principais de HLA-G, sendo que uma é caracterizada pela alta expressão gênica e produção da molécula e a outra pela baixa expressão. Dessa forma, vários estudos focam na história evolutiva desse gene, concluindo que o *HLA-G* está sob influência de pressão seletiva para invariância e sob seleção balanceadora, mantendo dois haplótipos divergentes em altas frequências (DONADI et al., 2011; SABBAGH et al., 2014; TURECK et al., 2013).

A alta variabilidade da região 3'-UTR também tem sido alvo de estudos, principalmente com relação à magnitude da expressão gênica e produção da molécula HLA-G.

#### 2.4.5 Variações na região 3'-UTR

A região 3'-UTR é sítio de inúmeros polimorfismos. De fato, seu valor de variação genética é mais alto que os valores referentes à maioria dos outros *loci* humanos já observados (SABBAGH et al., 2014). Um dos SNPs mais estudados está na posição +3187. O alelo contendo adenina (A) está relacionado à menor estabilidade do RNA mensageiro e, consequentemente, à baixa produção de HLA-G. Este SNP encontra-se próximo de uma sequência rica em AU, também vista no RNA mensageiro de outros componentes do sistema imune e que está relacionada à taxa de degradação do RNAm (YIE et al., 2008). Dessa forma, as variações próximas a essa região podem alterar a produção de HLA-G.

Outro polimorfismo muito estudado é uma inserção/deleção (in/del) de 14 pares de base. A presença dos 14 pares de base está associada a menores níveis de RNA mensageiro para todas as isoformas de HLA-G em comparação com a deleção desses nucleotídeos (HVIID et al., 2003). Estudos demonstraram que o genótipo

homozigoto para a inserção é mais frequente em pacientes com rejeição aguda no transplante renal do que em indivíduos saudáveis (CRISPIM et al., 2008).

Outras situações nas quais a presença de polimorfismos na região 3'-UTR foi avaliada incluem suscetibilidade a lúpus eritematoso sistêmico; suscetibilidade à tripanossomíase africana; suscetibilidade à doença do enxerto contra hospedeiro e, principalmente, à rejeição no transplante. Essas patologias sugerem a participação de HLA-G no controle da resposta imune, associando a alta ou baixa produção da molécula com a proteção ou suscetibilidade ao desenvolvimento das doenças (BOUKOUACI et al., 2011; CATAMO et al., 2015; COURTIN et al., 2013; CRISPIM et al., 2008; LUQUE et al., 2006; MISRA et al., 2014; QIU et al., 2006).

Dentre as variações nucleotídicas presentes na região 3'-UTR, do total de 14, 9 apresentam frequências polimórficas. Estes polimorfismos podem ser agrupados em haplótipos da região 3'-UTR. Dentre os haplótipos identificados, dois deles (UTR-1 e UTR-2) apresentam frequências muito altas e são divergentes entre si, apresentando mais evidências da seleção balanceadora (SABBAGH et al., 2014).

Ainda, as variações descritas para a região 3'-UTR de *HLA-G* apresentam potencial para alterar a afinidade a microRNAs (miRNAs) (CASTELLI et al., 2009). MiRNAs são RNAs pequenos não codificantes de aproximadamente 22 nucleotídeos, e sua ação consiste em regular negativamente a expressão dos genes cujos transcritos apresentam sítios de ligação para miRNAs (MANASTER et al., 2012). Nos últimos anos, tem sido demonstrada a regulação negativa de *HLA-G* por meio de miRNAs que se ligam à região 3'-UTR, como miR-133a, miR-148a, miR-148b e miR-152 (CASTELLI et al., 2010; GUAN et al., 2015; SELIGER, 2016).

As regiões de ligação desses miRNAs podem compreender sequências próximas a mutações, de maneira que a afinidade da ligação pode sofrer alterações de acordo com o alelo em questão.

Assim, a expressão de *HLA-G* também pode ser afetada pelos polimorfismos na região 3'-UTR, seja pela ação diferenciada de miRNAs, pela alteração da estabilidade do transcrito ou por mecanismos ainda não conhecidos. Independente disso, as respostas de imunotolerância mediadas por HLA-G ficam sujeitas a essa regulação, seja na gestação, em tumores, transplantes, ou onde quer que o HLA-G exerça função.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar as variantes polimórficas na região 3'-UTR do gene *HLA-G*, em pacientes transplantados renais com e sem rejeição clínica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e otimizar o método de amplificação e sequenciamento da região 3'-UTR do gene *HLA-G* em amostras de indivíduos saudáveis e pacientes transplantados renais;
- Determinar as frequências genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos da região 3'-UTR do gene *HLA-G* dos pacientes com e sem rejeição clínica e comparar com dados já publicados;
- Verificar a possível associação dos polimorfismos da região 3'-UTR com o maior ou menor risco de desenvolver rejeição, considerando-os em conjunto, como haplótipos, e isoladamente.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras utilizadas neste trabalho totalizaram 64 indivíduos transplantados divididos em dois grupos: 23 indivíduos sem rejeição ao enxerto (NR) e 41 pacientes que desenvolveram rejeição clínica (R), todos recrutados e monitorados no período de 2012 a 2017. Os pacientes são do sexo feminino e masculino, portadores de doença renal crônica, com idades entre 18 e 75 anos, e provenientes do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba situado no Paraná, Brasil. Todas as coletas de sangue e dados clínicos foram realizadas mediante autorização através da assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido segundo a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Paraná e do hospital envolvido (Número de aprovação – CAAE: 53627315.0.0000.0102).

### 4.2 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de sangue total foram centrifugadas por 15 minutos a 2000g para obtenção da camada leucocitária (*buffy coat*), a partir da qual foi realizada a extração do DNA total via método de *salting-out*, previamente ao início deste trabalho (LAHIRI; NURNBERGER, 1991).

### 4.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR

#### 4.3.1 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos usados para amplificação da região 3'-UTR foram HLAG8F (*forward*), de sequência 5'-TGTGAAACAGCTGCCCTGTG-3' e HGUT.R1 (*reverse*), de sequência 5'-TCTTCTGATAACACAGGAAGTTC-3', ambos gentilmente cedidos pelo professor Dr. Eduardo Donadi e doutoranda Bruna Bertol, do Laboratório

de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. A região compreendida entre os sítios de hibridização dos oligonucleotídeos incluem todos os polimorfismos de interesse para o trabalho (figura 5): inserção/deleção (in/del) de 14 pb (+2960; dbSNP: rs1704), e os SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) localizados a: +3003C>T (dbSNP: rs1707), +3010C>G (dbSNP: rs1710), +3027A>C (dbSNP: rs17179101), +3035C>T (dbSNP: rs17179108), +3142C>G (dbSNP: rs1063320), +3187A>G (dbSNP: rs9380142), +3196C>G (dbSNP: rs1610696) e +3227G>A (dbSNP: rs1233331).

FIGURA 5 – ESQUEMA DE POLIMORFISMOS ANALISADOS E REGIÕES DE HIBRIDIZAÇÃO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS

```

2923 TGTGAAACAG CTGCCCTGTG TGGGACTGAG TGGCAAGATT TGTTCATGCC
2973 TTCCCTTTGT GACTTCAAGA ACCCTGACTC CTCTTTGTGC AGAGACCAGC
3023 CCACCCCCTGT GCCCCACCATG ACCCTCTTCC TCATGCTGAA CTGCATTCCT
3073 TCCCCAATCA CCTTTCCTGT TCCAGAAAAG GGGCTGGGAT GTCTCCGTCT
3123 CTGTCTCAAA TTTGTGGTCC ACTGAGCTAT AACTTACTTC TGTATTAAAA
3173 TTAGAATCTG AGTATAAATT TACTTTTTCA AATTATTTC AAGAGAGATT
3223 GATGGGTTAA TTAAAGGAGA AGATTCCTGA AATTGAGAG ACAAATAAAA
3273 TGAAGACAT GAGAACTTTC CACAGTACAC GTGTTTCTTG TGCTGATTG
3323 TTGCAGGAGA GGAGAGTAGA TGGGGCTGCG CCCAGTGGGT GCTCAGGCCA
3373 CCATGAACTT TATGTGGTCA CTGCTCAGCT GGGTCATCTT TGCTGCTCCA
3423 TTGTCCTTGG CCCTTCAGTA GAACCTTGTC CCACCAGGAC CTGTGATCAC
3473 ATAGACTTGG ATATCACCTA GGATGGTCCC TACACGTAGA AGTTCCTGTG
3523 TTATCAGAAG A

```

Fonte: O autor, 2017.

Legenda: Destaque em amarelo – regiões de hibridização dos oligonucleotídeos

Destaque em cinza – região 3'-UTR de interesse

Em negrito e sublinhado – polimorfismos

#### 4.3.2 Otimização da PCR

A amplificação da região 3'-UTR foi realizada com os oligonucleotídeos já descritos, com o objetivo de produzir um fragmento de 597 pb (considerando a deleção no polimorfismo rs1704) ou 611 pb (considerando a inserção no polimorfismo rs1704). A otimização do protocolo inicial contou com a determinação da temperatura de hibridização ideal, através do método de PCR em gradiente de temperaturas. Além disso, também foram alterados o volume de cloreto de magnésio, oligonucleotídeos e DNA genômico para determinação da concentração ideal desses reagentes. A partir

dos resultados gerados nesses testes, foi possível a expansão do protocolo para o restante das amostras.

O protocolo inicial utilizado está demonstrado na tabela 2.

TABELA 2 – PROTOCOLO INICIAL PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR

Reagentes	Volume
Taq polimerase Hot Start (5 U/ $\mu$ L)	0,2 $\mu$ L
Tampão Taq Hot Start 5X	5 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 $\mu$ L
dNTPs (10 mM)	0,5 $\mu$ L
Oligonucleotídeo HLAG8F (10 pmol/ $\mu$ L)	1,25 $\mu$ L
Oligonucleotídeo HGUT.R1 (10 pmol/ $\mu$ L)	1,25 $\mu$ L
DNA genômico (50 ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
Água ultrapura estéril	14,3 $\mu$ L

Fonte: O autor, 2017.

Além disso, a ciclagem utilizada para amplificação da região 3'-UTR está descrita na tabela 3.

TABELA 3 – CICLAGEM DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR DE *HLA-G*

	TEMPERATURA	TEMPO	
Desnaturação inicial	94 °C	5 minutos	
Desnaturação	95 °C	45 segundos	
Hibridização	57 °C	45 segundos	32x
Alongamento	72 °C	1 minuto	
Alongamento final	72 °C	7 minutos	
	4 °C	$\infty$	

Fonte: O autor, 2017.

#### 4.4 ELETROFORESE

Para confirmar a amplificação da região de interesse e determinar os produtos de PCR amplificados com maior especificidade e intensidade, de acordo com o gradiente de temperaturas e alterações no volume de reagentes, foi utilizada a técnica de eletroforese preparada em gel de agarose (1%) com tampão TBE (10X Tris 107,81g/L; EDTA 5,8g/L; ácido bórico 55g/L). A cada 2 µL do produto amplificado foi homogeneizado 1 µL da solução contendo corante fluorescente *Gel Red* com azul de bromofenol a ser aplicado ao gel. As corridas foram realizadas a 100 V por aproximadamente 12 minutos para a separação das bandas, que foram visualizadas no transiluminador ultravioleta.

#### 4.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Para a purificação das sequências amplificadas pela PCR, foi utilizado o tratamento enzimático com Exonuclease I (EXO I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) para remoção do restante de oligonucleotídeos e nucleotídeos. Para um volume final de 10 µL, foram adicionados 6 µL do produto de PCR, 1 µL de EXOI (1 U) e 2 µL de SAP (0,66 U), além de 1 µL de tampão SAP. As reações foram colocadas no termociclador por 1 hora a 37 °C e 15 minutos a 80°C.

#### 4.6 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A etapa de sequenciamento dos fragmentos obtidos foi realizada pelo método de Sanger com o uso do kit BigDye 3.1 Terminator, da *Applied Biosystems*. Para a reação foram necessários 0,5 µL do oligonucleotídeo HGUT.R1 (10 pmol/µL); 1,5 µL de tampão BigDye 5X (*Applied Biosystems*); 1 µL do master mix BigDye, sendo que o volume ideal do produto amplificado e purificado ainda deveria ser determinado. Por fim, foi acrescentada água ultrapura estéril para um volume final de 10 µL.

A tabela 4 descreve a ciclagem seguida para a reação de sequenciamento.



TABELA 4 – CICLAGEM PARA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 3'-UTR DE *HLA-G*

	TEMPERATURA	TEMPO	
<b>Desnaturação inicial</b>	96 °C	1 minuto	
<b>Desnaturação</b>	96 °C	15 segundos	
<b>Hibridização</b>	54 °C	15 segundos	35x
<b>Alongamento</b>	60 °C	2 minutos	
	4 °C	∞	

Fonte: O autor, 2017.

Ao fim dos ciclos, o produto resultante foi purificado com 2 µL de acetato de sódio (7,5 M) e 25 µL etanol absoluto. Após centrifugação e lavagem do precipitado com 50 µL de etanol 80%, o produto foi encaminhado ao sequenciador ABI 3130 de acordo com as instruções do fabricante.

Seguido ao sequenciamento, a análise dos resultados obtidos foi feita com o auxílio de *softwares* especializados. Dentre eles, o *SeqScape* para análise do resultado do sequenciamento e identificação das variantes e o *software BioEdit* para o alinhamento das sequências. Além disso, os programas *Arlequin*, *Phase* e *Haploview* foram utilizados para a inferência de haplótipos, determinação de frequências alélicas e genótípicas, cálculo de equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação. Para as análises estatísticas inferenciais nas subpopulações (pacientes com e sem rejeição clínica), foram utilizados o teste exato de Fisher e o método de regressão logística binária para as análises de associação entre os polimorfismos e o risco de desenvolvimento de rejeição ao enxerto renal.

## 5 RESULTADOS

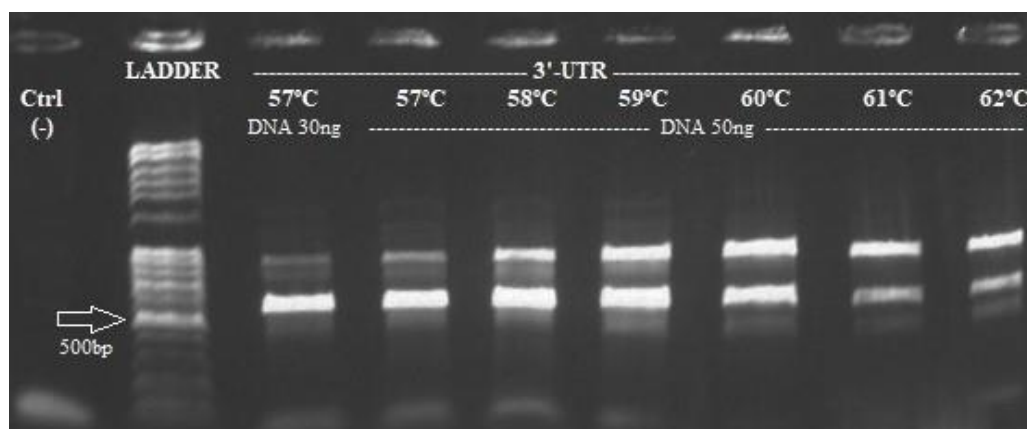
### 5.1 PADRONIZAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA

#### 5.1.1 Amplificação da região 3'-UTR

A metodologia de amplificação da região 3'-UTR do gene *HLA-G* foi realizada a partir de um protocolo inicial, mostrado previamente na tabela 2. Este protocolo inicial não resultou em amplificação satisfatória, pois apresentou bandas inespecíficas, bem como resíduos de reagentes de PCR. As alterações de volume de reagentes citadas a seguir foram compensadas pela alteração no volume de água nas reações, de forma que o volume final de cada reação de amplificação fosse sempre de 25  $\mu$ L.

Visando aumentar a especificidade e reduzir os resíduos, foi realizada a reação de PCR usando um gradiente de temperaturas de hibridização, variando de 57 °C a 62 °C e, ainda, reduzindo a quantidade de DNA para 30 ng (0,6  $\mu$ L) à temperatura de hibridização de 57 °C. Os resultados deste teste estão demonstrados no gel de eletroforese na figura 6.

FIGURA 6 – TESTE DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR



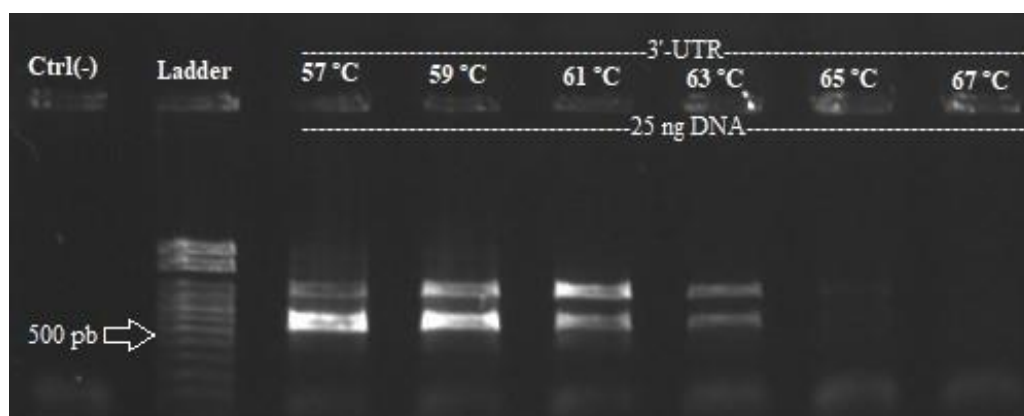
Fonte: O autor, 2017.

A figura demonstra a existência do fragmento de tamanho esperado (597 pb) em todas as reações, porém, com maior intensidade e especificidade quando a temperatura de hibridização era de 57 °C em conjunto com o uso de 30 ng de DNA.

Como a corrida eletroforética ainda parecia inespecífica, o volume de DNA foi novamente diminuído, testando-se a reação com 0,4 µL e 0,5 µL, respectivamente 20 ng e 25 ng de DNA. Neste teste, o produto amplificado a partir de 25 ng de DNA se mostrou com intensidade satisfatória na eletroforese, embora ainda parcialmente inespecífico.

Tendo em vista que uma nova diminuição da quantidade de material genético na amostra poderia comprometer a eficiência da amplificação, optou-se por utilizar 25 ng de DNA e alterar outros parâmetros da reação de PCR. Para isso, foi realizada uma nova amplificação em gradiente de temperaturas de hibridização, onde foi confirmada a temperatura de 57 °C como ideal, de acordo com gel de eletroforese exposto na figura 7.

FIGURA 7 – TESTE DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR COM GRADIENTE DE TEMPERATURAS DE HIBRIDIZAÇÃO



Fonte: O autor, 2017.

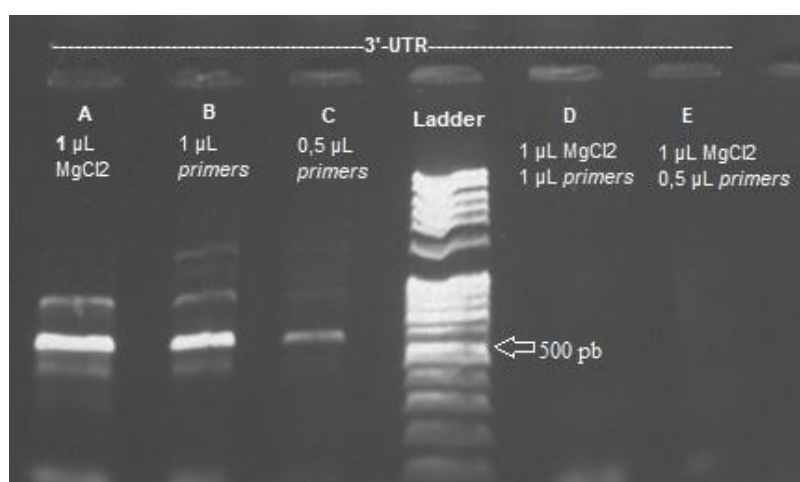
A banda de interesse apresentada na reação a 57 °C demonstrou a maior distinção e intensidade que as outras reações. Assim, essa foi a temperatura de hibridização adotada no protocolo.

Além disso, para determinar se o protocolo poderia se tornar ainda mais específico, foram realizadas novas alterações na quantidade de reagentes. Na

tentativa de tornar a atividade da enzima Taq polimerase mais específica, foi diminuída a quantidade de cloreto de magnésio e oligonucleotídeos na reação.

Essas alterações foram realizadas separadamente e em conjunto, como demonstrado na figura 8.

FIGURA 8 – TESTE DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR COM ALTERAÇÕES NOS VOLUMES DE REAGENTES



Fonte: O autor, 2017.

Conforme o gel de eletroforese representado na figura acima, a reação B apresentou melhor distinção e intensidade de banda se comparada às outras reações. A reação C apresentou maior especificidade, porém baixa intensidade de banda. Ainda assim, esta reação também foi considerada na etapa de sequenciamento, na tentativa de evitar a sobreposição de eletroferogramas devido ao fragmento de DNA resultante da banda inespecífica. A diminuição de cloreto de magnésio não teve efeito sobre o resultado da amplificação.

#### 5.1.2 Sequenciamento do produto de amplificação

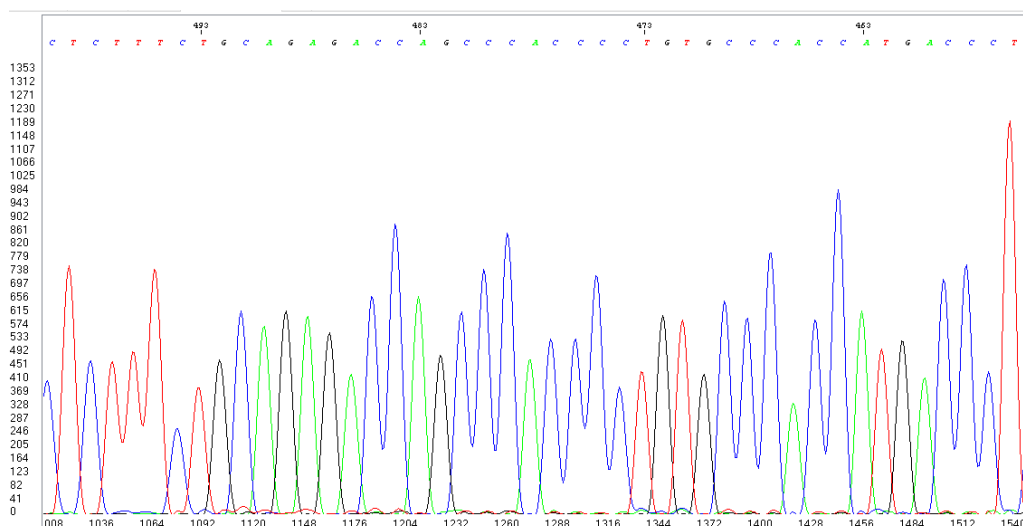
As reações B e C resultantes do último teste de amplificação foram purificadas com o uso das enzimas EXOI e SAP, como descrito anteriormente. A partir desse produto, foi realizada a reação de sequenciamento partindo do protocolo inicial já citado, sendo que o volume do produto amplificado ainda deveria ser determinado.

A primeira reação de sequenciamento foi desenvolvida com 0,5 µL do produto amplificado da reação B. A segunda reação utilizou 1 µL do mesmo produto. As duas últimas reações de sequenciamento utilizaram o produto amplificado da reação C em volumes de 1 e 2 µL. Em todas as reações, as alterações de volumes de reagente foram compensadas com a alteração no volume de água, totalizando um volume final de 10 µL por reação.

Após o sequenciamento, o produto foi precipitado e encaminhado ao sequenciador. As reações que utilizaram o produto de amplificação C não emitiram sinal no equipamento, sendo desconsideradas.

Dentre as reações contendo o produto amplificado B, a primeira, contendo 0,5 µL do produto, apresentou um eletroferograma com alto grau de ruído, o que afetou a leitura dos picos e determinação de bases. Já a segunda reação, com 1 µL do produto B, apresentou um eletroferograma limpo e sem ruídos (figura 9). Além disso, o alinhamento da sequência condiz com a região 3'-UTR, não sofrendo interferência da leve banda inespecífica observada.

FIGURA 9 – FRAGMENTO DO ELETROFEROGRAMA RESULTANTE DA OTIMIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO



Fonte: O autor, 2017.

Dessa forma, ao fim da padronização, os protocolos da reação de amplificação e sequenciamento adaptados à região de interesse deste trabalho estão descritos nas tabelas 5 e 6.

TABELA 5 – PROTOCOLO FINAL DA REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO 3'-UTR DO GENE *HLA-G*

Reagentes	Volume	Concentração Final
Taq polimerase (5 U/μL)	0,2 μL	0,04 U/μL
Tampão Taq 5X	5 μL	1X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 μL	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,5 μL	0,2 mM
Oligonucleotídeo HLAG8F (10 pmol/μL)	1 μL	0,4 pmol/μL
Oligonucleotídeo HGUT.R1 (10 pmol/μL)	1 μL	0,4 pmol/μL
DNA genômico (50 ng/μL)	0,5 μL	1 ng/μL
Água ultrapura estéril	15,3 μL	

Fonte: O autor, 2017.

TABELA 6 – PROTOCOLO FINAL DA REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO 3'-UTR DO GENE *HLA-G*

Reagentes	Volume
Tampão BigDye 5X	1,5 μL
Master mix BigDye	1 μL
Oligonucleotídeo HGUT.R1 (10 pmol/μL)	0,5 μL
Produto da amplificação purificado	1 μL
Água ultrapura estéril	6 μL

Fonte: O autor, 2017.

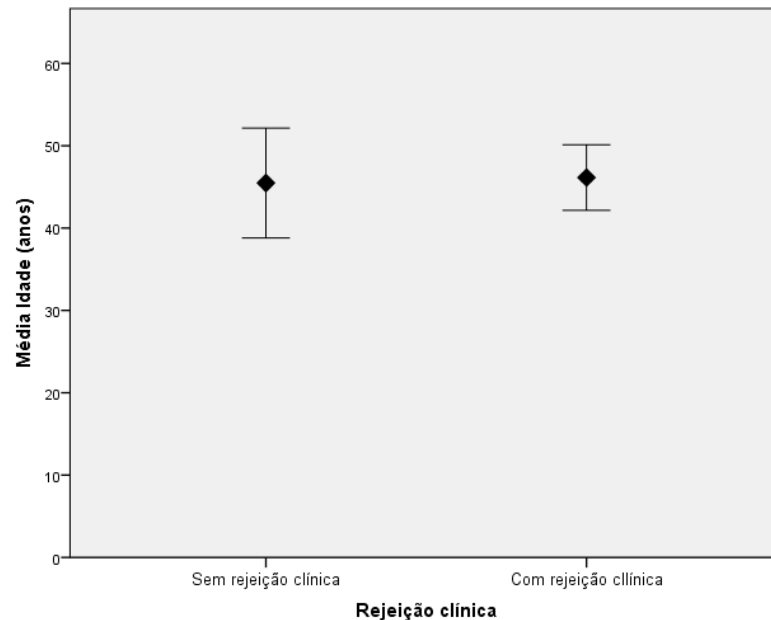
## 5.2 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA NA POPULAÇÃO EM ESTUDO

### 5.2.1 Caracterização da população em estudo

A metodologia otimizada e padronizada foi aplicada a amostras de 64 indivíduos transplantados renais, separados em 23 indivíduos que não apresentaram rejeição clínica ao enxerto (grupo NR) e 41 indivíduos que apresentaram rejeição clínica ao enxerto (grupo R). Foi realizado um teste U de Mann-Whitney, onde foi evidenciado o pareamento de acordo com as idades dos pacientes (figura 10),

observando-se que a distribuição das idades dos indivíduos em cada grupo é semelhante ( $p>0,05$ ).

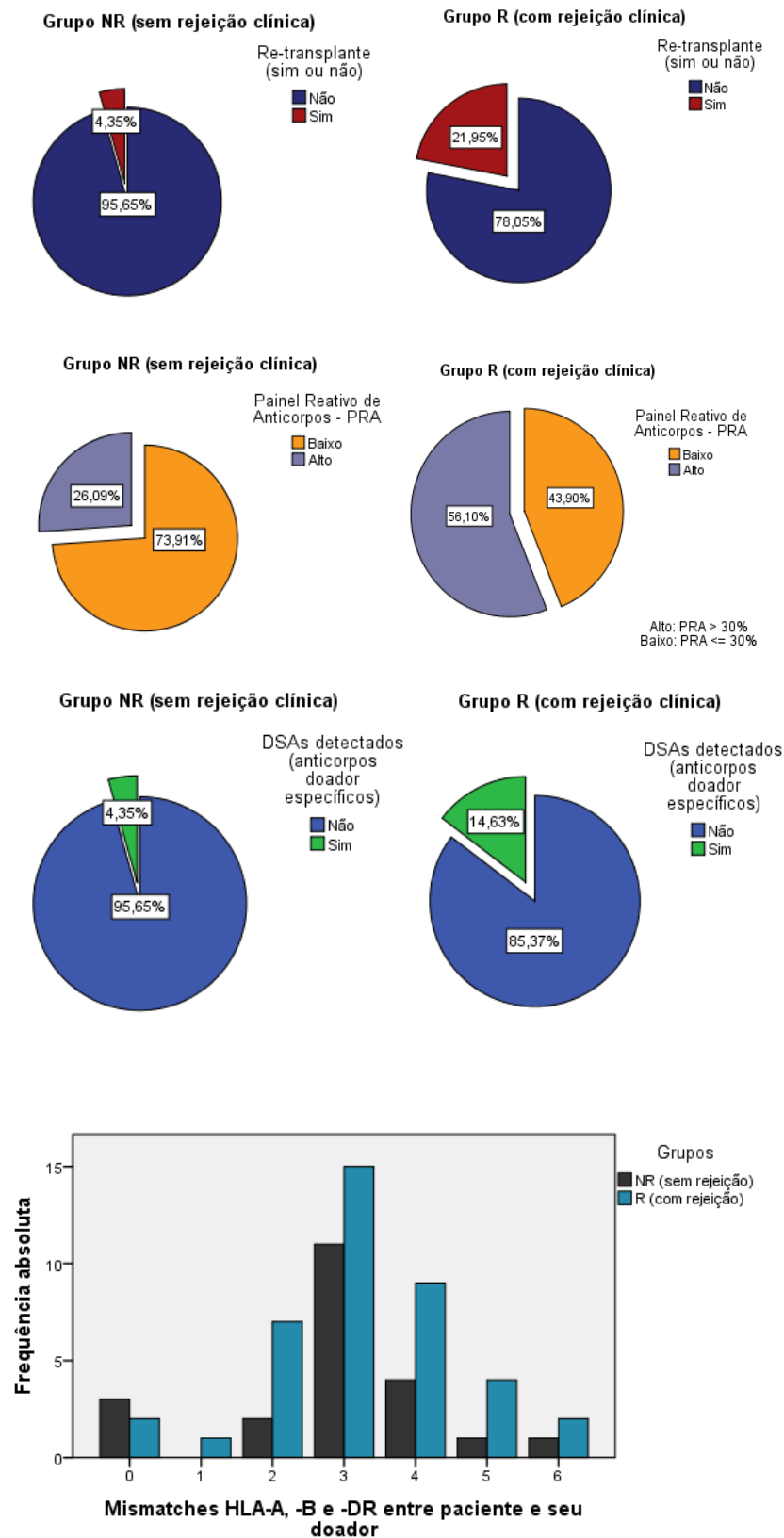
FIGURA 10 – APRESENTAÇÃO DOS GRUPOS PAREADOS DE ACORDO COM A IDADE DOS INDIVÍDUOS (INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95%)



Fonte: O autor, 2017.

Além disso, foram analisadas informações referentes a dados clínicos que estão associados ao risco de desenvolvimento de rejeição. Estes dados estão apresentados na figura 11 e se referem a variáveis clínicas coletadas no período pré-operatório.

FIGURA 11 – DADOS CLÍNICOS RELEVANTES AO RISCO DE REJEIÇÃO OBSERVADOS NOS PACIENTES



Fonte: O autor, 2017.



### 5.2.2 Caracterização da região 3'-UTR de *HLA-G* na população em estudo

As sequências resultantes do sequenciamento da região 3'-UTR de *HLA-G* foram analisadas e alinhadas através do *software* SeqScape v2.7, da *Applied Biosystems*, com o auxílio do BioEdit, para detecção das variações de interesse.

Os resultados brutos não contêm informações sobre a fase gamética dos polimorfismos, de forma que foram utilizados os *softwares* Arlequin (algoritmo ELB e EM) e PHASE para determinação dos haplótipos presentes em cada cromossomo do indivíduo. As inferências haplotípicas determinadas pelos dois programas de análise apresentaram resultados idênticos. A tabela 7 expõe as combinações de alelos dos polimorfismos encontrados nos dois grupos analisados na forma de haplótipos. A nomenclatura destes haplótipos foi proposta por Castelli e colaboradores (2010) e desde então vem sendo adotada na caracterização da região 3'-UTR do gene *HLA-G*.

TABELA 7 – HAPLÓTIPOS UTR ENCONTRADOS NOS GRUPOS ESTUDADOS

	in/del 14 pb	+3003	+3010	+3027	+3035	+3142	+3187	+3196	+3227
UTR-1	del	T	G	C	C	C	G	C	G
UTR-2	in	T	C	C	C	G	A	G	G
UTR-3	del	T	C	C	C	G	A	C	G
UTR-4	del	C	G	C	C	C	A	C	G
UTR-5	in	T	C	C	T	G	A	C	G
UTR-6	del	T	G	C	C	C	A	C	G
UTR-7	in	T	C	A	T	G	A	C	G
UTR-13	del	T	C	C	T	G	A	C	G
UTR-15	in	T	C	C	C	G	A	C	G
UTR-18	del	T	G	C	C	C	A	C	A
UTR-34	del	T	G	C	C	G	A	G	G

Fonte: O autor, 2017.

Para caracterização dos grupos estudados e seus haplótipos, foi realizado o teste exato de Fisher como forma de detectar variações populacionais significativas, usando como base na literatura científica o estudo de Castelli e colaboradores (2017), sendo que os resultados estão presentes na tabela 8.

**TABELA 8 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS ENCONTRADAS NOS GRUPOS DO PRESENTE ESTUDO EM COMPARAÇÃO COM OS DADOS ENCONTRADOS NA LITERATURA**

Haplótipo	Frequência Absoluta (2n = 128)	Frequência Relativa	Frequência Relativa (Castelli et al, 2017) (2n = 630)	p-value (Teste Exato de Fisher)
UTR-1	37	0,289	0,286	1,03
UTR-2	34	0,266	0,252	0,88
UTR-3	19	0,148	0,148	1,18
UTR-4	12	0,094	0,105	0,88
UTR-5	8	0,063	0,082	0,63
UTR-6	4	0,031	0,018	0,41
UTR-7	5	0,039	0,059	0,53
UTR-13	1	0,008	*	0,22
UTR-15	2	0,016	0,008	0,06
UTR-18	4	0,031	0,032	1,25
UTR-34	2	0,016	*	0,06

\* O estudo populacional analisado não contempla os haplótipos em questão (ver item 6).  
Fonte: CASTELLI et al., 2017

Também, utilizando os dados de frequências haplotípicas de cada um dos grupos estudados, foi realizado o teste exato de Fisher para verificar a possível associação entre os haplótipos encontrados e o risco de desenvolvimento da rejeição ao enxerto renal (tabela 9).

TABELA 9 – FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS RELATIVAS DISCRIMINADAS POR GRUPO

<b>Haplótipo</b>	<b>Grupo NR (2n = 46)</b> Frequência Relativa	<b>Grupo R (2n = 82)</b> Frequência Relativa	<b>p-value</b> <b>(Teste Exato de Fisher)</b>
UTR-1	0,304	0,280	1,06
UTR-2	0,261	0,268	1,10
UTR-3	0,130	0,159	0,88
UTR-4	0,109	0,085	1,06
UTR-5	0,065	0,061	1,38
UTR-6	0,043	0,024	0,91
UTR-7	0,000	0,061	0,21
UTR-13	0,000	0,012	1,28
UTR-15	0,000	0,024	0,82
UTR-18	0,043	0,024	0,91
UTR-34	0,043	0,000	0,25

Fonte: O autor, 2017.

Os testes realizados incluíram a análise separada de cada um dos polimorfismos visando a comparação e detecção de possível associação entre as variações e a aceitação do enxerto renal. As frequências relativas de cada genótipo separado por grupo estão na tabela 10, juntamente com o *p*-value derivado do teste exato de Fisher, realizado para averiguar diferenças significativas entre os genótipos e o desenvolvimento da rejeição ao transplante.

O mesmo teste estatístico foi realizado para comparação das frequências alélicas em cada polimorfismo nos diferentes grupos, entretanto, não foram evidenciadas diferenças significativas.

TABELA 10 – FREQUÊNCIAS RELATIVAS DOS GENÓTIPOS ANALISADOS DISCRIMINADOS POR GRUPO E RESULTADO DO TESTE EXATO DE FISHER ENTRE O GRUPO NR E R

		Grupo NR (2n = 46)	Grupo R (2n = 82)	p-value (Teste Exato de Fisher)
Polimorfismo	Genótipo	Frequência Relativa	Frequência Relativa	
<b>+2960ins/del</b>	del/del	0,42	0,58	0,61
	ins/del	0,33	0,67	0,92
	ins/ins	0,27	0,73	0,77
<b>+3003T&gt;C</b>	C/C	1,00	0,00	0,72
	C/T	0,30	0,70	0,97
	T/T	0,36	0,64	1,31
<b>+3010G&gt;C</b>	C/C	0,38	0,62	1,41
	C/G	0,19	0,81	<b>0,02</b>
	G/G	0,62	0,38	<b>0,03</b>
<b>+3027C&gt;A</b>	C/A	0,00	1,00	0,20
	C/C	0,39	0,61	0,20
<b>+3035C&gt;T</b>	C/C	0,38	0,62	0,60
	C/T	0,30	0,70	0,97
	T/T	0,00	1,00	0,81
<b>+3142C&gt;G</b>	C/C	0,60	0,40	0,06
	C/G	0,19	0,81	<b>0,02</b>
	G/G	0,41	0,59	0,80
<b>+3187A&gt;G</b>	A/A	0,38	0,62	0,88
	G/A	0,26	0,74	0,34
	G/G	0,57	0,43	0,41
<b>+3196C&gt;G</b>	C/C	0,37	0,63	1,03
	C/G	0,27	0,73	0,44
	G/G	0,57	0,43	0,41
<b>+3227G&gt;A</b>	G/A	0,50	0,50	0,91
	G/G	0,35	0,65	0,91

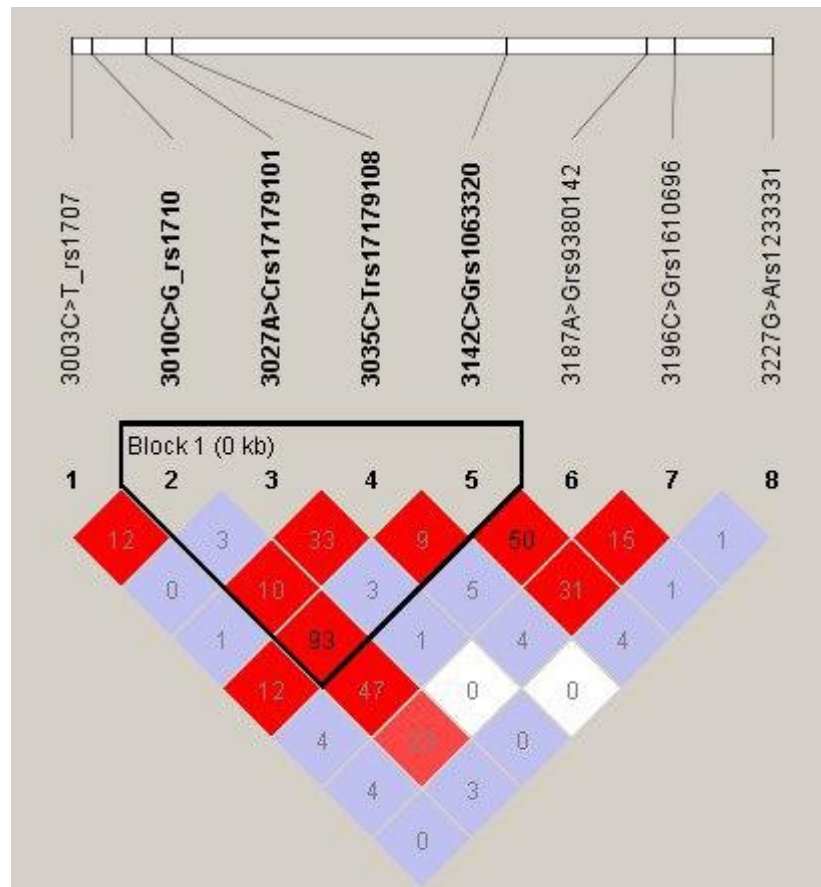
Fonte: O autor, 2017.

Os valores destacados na tabela 10 se referem a valores significativos ( $p < 0,05$ ). Para estes genótipos, foi determinado o *odds ratio* visando defini-los como possíveis fatores de proteção ou de risco para a rejeição. Para o polimorfismo na posição +3010, o genótipo C/G apresentou OR de 4,17 enquanto G/G apresentou OR de 0,22. Considerando o SNP na posição +3142, o genótipo C/G apresentou OR de 4,17. Os resultados estão dentro do intervalo de confiança de 95%.

Ainda, foi avaliado o desequilíbrio de ligação entre os SNPs descritos. Entre os polimorfismos que se apresentaram como significativos no teste de Fisher, foi observado desequilíbrio entre +3010C/+3142G e +3010G/+3142C ( $D' = 1$ ), e para

+3010C/+3142C e +3010G/+3142G ( $D' = -1$ ), com valor de  $r^2$  de 0,9389. Utilizando o Haploview foi possível fazer a representação visual do desequilíbrio de ligação entre todos os SNPs (figura 12). O polimorfismo rs1704 (in/del de 14 pb) não pode ser incluído devido as limitações apresentadas pelo próprio *software*, entretanto, o cálculo anterior mostrou desequilíbrio de ligação deste polimorfismo com todos os outros, exceto o da posição +3227 (rs123331), embora com valores baixos ou moderados de  $r^2$ .

FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO OBSERVADO ENTRE OS SNPS ANALISADOS



Fonte: O autor, 2017.

Outro método estatístico utilizado foi a regressão logística binária, como forma de análise multivariada, considerando como variável de resposta a rejeição clínica e como variáveis de ajuste o PRA (alto, quando acima de 30% ou baixo, quando igual ou abaixo de 30%), se o indivíduo já havia realizado transplante ou não, o número de *mismatches* HLA-A, -B e -DR e a presença ou ausência de DSAs. Dois modelos foram

propostos pela análise para explicar quais variáveis estariam envolvidas com a rejeição. O modelo que apresentou maior poder de predição (77,4%) incluiu o PRA como variável explicativa. A análise também evidenciou o SNP na posição +3010 como sendo relevante para o desenvolvimento da rejeição.

Como forma de facilitar a interpretação dos resultados, cada genótipo foi analisado separadamente. Foi usada a transformação em variável *dummy* (1 para a presença do genótipo e 0 para sua ausência) para cada genótipo referente à posição +3010, com o objetivo de atribuir a cada genótipo um valor de proteção ou risco.

A análise do genótipo +3010C/C não apresentou significância ( $p = 0,476$ ) neste modelo de análise, corroborando com o que já havia sido mostrado na estatística básica.

A análise do genótipo +3010C/G evidenciou que a sua presença eleva o risco de desenvolvimento da rejeição em até 5 vezes, comparando-o com aqueles indivíduos que não apresentam este genótipo ( $OR = 5,168$ ).

Por fim, a análise do genótipo +3010G/G mostrou que sua presença atua como um fator de proteção contra a rejeição, comparando-o com aqueles indivíduos que não apresentam este genótipo ( $OR = 0,247$ ). Estes resultados estão descritos na tabela 11.

TABELA 11 – VARIÁVEIS EVIDENCIADAS PELO MÉTODO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA BINÁRIA ASSOCIADAS A REJEIÇÃO CLÍNICA.

Variáveis	B	p-value	OR	Intervalo de Confiança (95%)	
				Mínimo	Máximo
PRA > 30%	1,453	0,023	4,277	1,227	14,912
SNP3010 C/G	1,642	0,012	5,168	1,429	18,565
SNP3010 G/G	-1,397	0,031	0,247	0,069	0,882

Fonte: O autor, 2017.

## 6 DISCUSSÃO

O *HLA-G* se diferencia dos *HLA* clássicos por aspectos que incluem sua atuação como modulador imune, propiciando a imunotolerância natural no organismo. Por apresentar esta característica, sua relação com a atividade do sistema imune vem sendo largamente estudada. Uma das situações em que a expressão do gene e produção da molécula *HLA-G* podem trazer benefícios ao indivíduo está no contexto do transplante de órgãos. A ação do *HLA-G* sobre células do sistema imune é inibitória, de forma que a produção desta proteína faz com que o equilíbrio imunológico seja deslocado para a inibição de inúmeras linhagens celulares imunes. Esta alteração do balanço imunológico combate respostas imunes descontroladas, como acontece na rejeição de órgãos transplantados. Portanto, a expressão de *HLA-G* em pacientes submetidos a transplantes renais também pode ser estudada como uma possível variável relacionada à aceitação do enxerto.

As variações nucleotídicas na região 3'-UTR do gene entram nesse contexto por se apresentarem como fatores que alteram a regulação da expressão de *HLA-G*. Um dos mecanismos propostos para explicar essa alteração é a presença de mutações em locais próximos a sítios de ligação de miRNAs, além de polimorfismos que modificam a estabilidade do transcrito.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar os polimorfismos da região 3'-UTR do gene *HLA-G* de pacientes transplantados renais que desenvolveram rejeição ao enxerto em comparação àqueles que se mantiveram saudáveis.

Para isso, foi realizada a padronização da metodologia de amplificação e sequenciamento da região de interesse. A metodologia foi desenvolvida com o intuito de ser aplicada futuramente tanto em pacientes transplantados quanto em pacientes que não foram submetidos ao transplante, de forma que as adaptações do protocolo foram testadas e validadas em amostras destas duas categorias.

As adaptações de metodologia se fizeram necessárias primordialmente para aumentar a especificidade da amplificação da região alvo. Foram realizadas reduções nas quantidades de DNA genômico, cloreto de magnésio e oligonucleotídeos utilizados nas reações, sendo que apenas as modificações envolvendo o DNA e

oligonucleotídeos se mostraram efetivas no aumento da especificidade da reação. Além das adaptações realizadas em termos de reagentes, a temperatura de hibridização ideal dos oligonucleotídeos também foi testada, o que resultou na manutenção da temperatura de 57 °C, incluída no protocolo inicial, como ideal na etapa citada.

Os protocolos finais resultantes da padronização e otimização das metodologias de amplificação e sequenciamento foram utilizados na obtenção dos dados apresentados neste trabalho.

As informações genéticas obtidas com os procedimentos de amplificação e sequenciamento foram agrupadas em indivíduos transplantados que desenvolveram rejeição clínica (R) e que não a desenvolveram (NR). Algumas variáveis clínicas destes pacientes foram utilizadas na caracterização dos grupos, majoritariamente variáveis que estão associadas ao risco de desenvolvimento de rejeição. No presente trabalho, as variáveis caracterizadas nestes grupos foram inseridas como variáveis de ajuste no modelo de regressão logística binária.

Os dois grupos analisados neste estudo (NR e R) foram avaliados em conjunto no teste para equilíbrio de Hardy-Weinberg, por serem derivados da mesma população. O teste, realizado através do *software* Arlequin, confirmou que os indivíduos destes grupos constituem uma amostra representativa da população em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$  para todos os *loci* analisados), até porque não é esperado que um evento não natural, como o transplante, altere esse equilíbrio.

Além disso, o programa Arlequin também foi utilizado em conjunto com o PHASE para se inferir os haplótipos presentes em cada cromossomo dos indivíduos, visto que as técnicas de sequenciamento aqui realizadas não permitem a diferenciação da fase alélica dos *loci* estudados. Os algoritmos ELB (*Excoffier-Laval-Balding algorithm*) e EM (*expectation-maximization algorithm*) foram avaliados pelo *software* Arlequin e o algoritmo PHASE foi rodado no *software* de mesmo nome. Os dois programas produziram informações idênticas de inferência haplotípica, ressaltando a confiabilidade destes resultados e das análises subsequentes. A literatura apresenta mais de 40 haplótipos já identificados da região 3'-UTR do gene *HLA-G*, entretanto, apenas 8 deles estão presentes em frequências maiores que 1% a nível global (SABBAGH et al., 2014). Neste trabalho, foram encontrados 11



diferentes haplótipos UTR, 10 deles com frequência relativa acima de 1%. Entretanto, estes valores derivam de um número amostral baixo e, por isso, não devem ser tomados como absolutos.

As frequências dos haplótipos encontrados no presente trabalho foram comparadas às do estudo de Castelli e colaboradores, de 2017, que caracteriza a região 3'-UTR de *HLA-G* na população do estado de São Paulo. O teste exato de Fisher não aponta diferenças entre a população aqui estudada e a já caracterizada população paulista ( $p > 0,05$ ).

Uma informação que merece atenção é a existência dos haplótipos UTR-15 e UTR-34 nos grupos estudados neste trabalho, o que não foi evidenciado na população caracterizada por Castelli e colaboradores. Apesar de estarem exclusivamente presentes na população aqui descrita, a presença destes haplótipos não apresentou significância estatística. Assim, um estudo de caracterização da população paranaense ou dos três estados do sul do Brasil poderia esclarecer se a presença destes haplótipos nesta amostra é uma exceção ou se existe uma base geográfica e histórica evolutiva que justifica este fato.

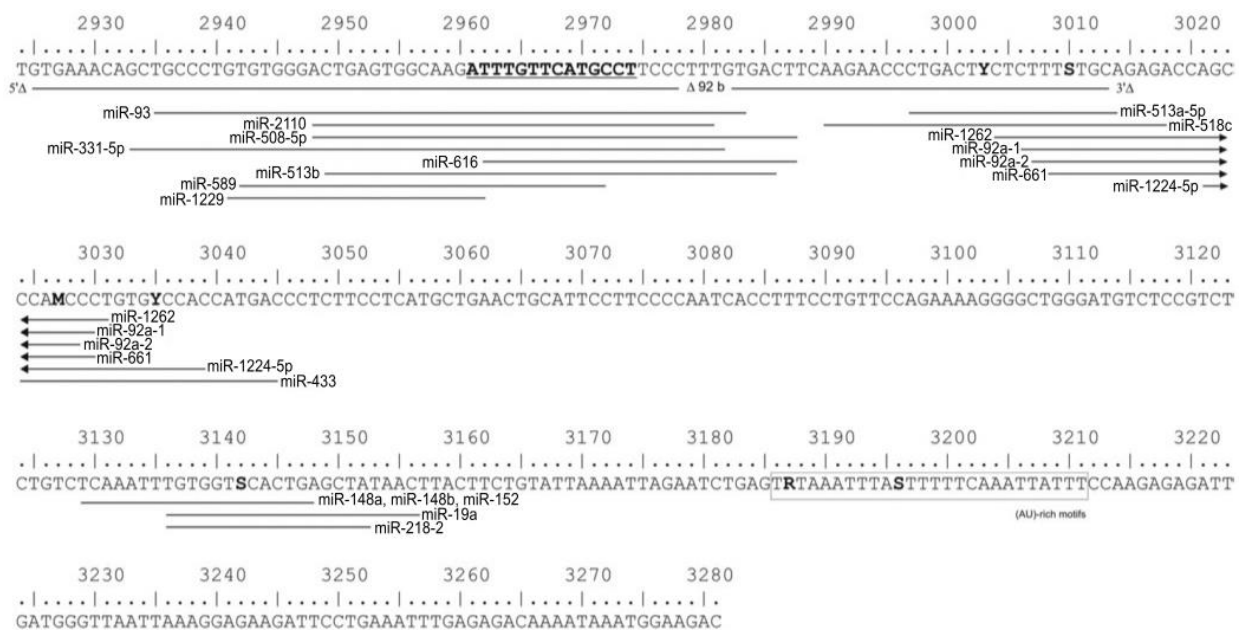
Finalizando as análises haplotípicas, foi realizado um novo teste exato de Fisher para averiguar se a presença de haplótipos específicos poderia estar associada ao desenvolvimento da rejeição do enxerto renal, uma vez que há classificações que separam os haplótipos em grupos de alta ou baixa produção de HLA-G. Assim, haplótipos associados à alta produção de HLA-G poderiam estar relacionados à proteção do enxerto por deslocar o balanço imunológico em direção à inibição. Entretanto, o teste realizado não apontou diferenças entre a presença dos diversos haplótipos e a aceitação ou rejeição do transplante. Isto mostra que os polimorfismos, quando considerados agrupados, não possuem significância sobre a rejeição imunológica. O que poderia ser questionado é se estes polimorfismos possuem influência sobre a rejeição quando considerados isoladamente.

Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos com relação à presença dos diferentes alelos em cada polimorfismo, entretanto, a análise de genótipos demonstrou significância entre os dois grupos em relação aos SNPs nas posições +3010 (genótipos C/G e G/G) e +3142 (genótipo C/G).

O cálculo de *odds ratio* para os genótipos do polimorfismo na posição +3010 sugerem que C/G é fator de risco para o desenvolvimento da rejeição, enquanto G/G pode conferir proteção. A literatura, com relação a esse SNP e sua influência na expressão de *HLA-G*, ainda é escassa, dificultando a interpretação dos resultados. Um estudo brasileiro de 2013 identificou uma associação entre o alelo C deste SNP e a suscetibilidade ao lúpus eritematoso sistêmico, embora também não sugira um mecanismo pelo qual esta influência ocorre (LUCENA-SILVA et al., 2013).

Estudos *in silico* sugerem que esta posição está incluída na região de ligação de vários miRNAs (figura 13). Esta informação, somada aos resultados deste e outros trabalhos de associação, podem indicar que o polimorfismo em questão é relevante.

FIGURA 13 – SÍTIOS DE LIGAÇÃO A MIRNAS NA REGIÃO 3'-UTR DO GENE *HLA-G*



Fonte: Adaptado de CASTELLI et al., 2009.

O polimorfismo na posição +3142 tem sido estudado também por ser parte do sítio de ligação a miRNA, principalmente ao miR-148a, miR-148b e miR-152. Sabe-se que o alelo G deste polimorfismo está relacionado à maior afinidade de ligação a esses miRNAs (PORTO et al., 2015). Assim, a presença da guanina nesta posição faz com que a ação do miRNA ligante seja mais intensa, diminuindo a tradução do RNAm e,

consequentemente, a produção de HLA-G. O baixo nível de HLA-G pode não ser tão efetivo na inibição do sistema imune, dificultando a aceitação do enxerto renal.

Tendo esses SNPs com influência similar sobre o risco de rejeição, foi calculado o desequilíbrio de ligação. Notavelmente, o desequilíbrio de ligação que se mostrou mais forte é, de fato, entre os SNPs nas posições +3010 e +3142, identificados como estatisticamente significativos. O alelo C da posição +3010 se mostrou em forte desequilíbrio com o alelo G da posição +3142, bem como o alelo G de +3142 se mostrou em forte desequilíbrio com o alelo C de +3010. Dessa forma, na maior parte das vezes em que um indivíduo é homozigoto +3010G/G, seu genótipo +3142 será C/C, não apresentando a guanina que aumenta a afinidade de ligação dos miRNAs já citados. Esta pode ser uma explicação para o genótipo G/G de +3010 ter sido considerado protetor no cálculo do *odds ratio*, bem como para o fato de heterozigotos (contendo +3010C e, consequentemente, +3142G) apresentarem suscetibilidade à rejeição.

Visando aprimorar as análises de associação, foi utilizado o método de regressão logística binária para gerar um modelo que explicasse o risco de desenvolvimento de rejeição com base nos polimorfismos e também em variáveis já associadas à rejeição, como PRA, número de *mismatches HLA*, presença de DSAs e retransplante. O melhor modelo gerado pela análise considerou como variáveis relevantes à aceitação do enxerto o PRA e o polimorfismo da posição +3010.

O método de regressão logística trabalha com uma categoria de referência dentro de cada variável, à qual as outras categorias serão comparadas. A partir do primeiro resultado obtido, foram realizados testes, incluindo em cada análise apenas um dos três possíveis genótipos da posição +3010. Assim, a presença de cada um deles foi comparada à sua ausência, de forma que os resultados evidenciaram o efeito da presença dos genótipos em detrimento da sua ausência (categoria de referência).

Os novos resultados continuaram apresentando o genótipo C/G na posição +3010 como fator de risco em comparação aos outros genótipos ( $p < 0,05$ ; OR = 5,168).

A comparação do homozigoto +3010G/G novamente constatou este como um fator de proteção à rejeição do enxerto renal, ( $p < 0,05$ ; OR = 0,247). A análise da influência de +3010C/C exclui este genótipo como variável explicativa do modelo.

Assim, confirmou-se que +3010C/C não teve influência sobre a aceitação do transplante para os pacientes estudados.

As análises de regressão demonstraram com unanimidade que o PRA acima de 30% é fator de risco (OR = 4,277) em comparação ao PRA igual ou abaixo de 30%, sugerindo a ocorrência de rejeições mediadas por anticorpos.

Com a comparação simultânea de todos os SNPs e a adição de variáveis de ajuste, o método de regressão logística binária não evidenciou o polimorfismo na posição +3142 como fator associado à rejeição. Fatores que podem ter ocasionado esta exclusão são o baixo número amostral e também o fato do seu desequilíbrio com a posição +3010 não ser total, mesmo sendo forte. Possivelmente há outros fatores associados ao SNP da posição +3010 que o tornaram mais importante neste modelo de estudo do que aquele na posição +3142, como o desequilíbrio de ligação com a região promotora do gene.

Dentre as aplicações do conhecimento sobre *HLA-G* e a influência dos polimorfismos genéticos sobre a sua expressão, encontra-se um ponto de vista que sugere que fatores genéticos associados à proteção do enxerto podem, no futuro, ser tomados como base para se reduzir a terapia imunossupressora em indivíduos que já apresentam esta proteção. Dessa forma, pode ser sugerido o polimorfismo da posição +3010 como um novo alvo para estudos com este objetivo.

## 7 CONCLUSÕES

O presente trabalho conduziu a padronização e otimização da metodologia de amplificação e sequenciamento da região 3'-UTR do gene *HLA-G*, produzindo um protocolo que foi expandido para as amostras utilizadas no decorrer do estudo.

Os grupos discutidos no trabalho (NR – sem rejeição clínica; R – com rejeição clínica) não apresentaram diferenças entre as frequências de haplótipos UTR encontradas em cada grupo.

Os grupos também não apresentaram diferenças nas frequências alélicas dos polimorfismos da região 3'-UTR de *HLA-G*.

A análise genotípica sugere que o SNP na posição +3010 tem influência sobre a aceitação do enxerto, sendo que o homozigoto G/G tem efeito protetivo e o heterozigoto G/C é fator de risco para rejeição. Também o SNP na posição +3142 foi avaliado como fator de risco segundo as análises realizadas com base no teste exato de Fisher.

A análise de regressão logística binária, que incluiu variáveis clínicas, também apontou o genótipo heterozigoto +3010C/G como fator de risco para rejeição, juntamente com uma porcentagem alta de PRA (PRA > 30%), enquanto que o genótipo +3010G/G foi confirmado como fator de proteção. Entretanto, o polimorfismo na posição +3142 não foi visto como significativo por meio deste modelo.

Para estudos futuros, recomenda-se o aumento do número amostral, para que seja realizada uma análise populacional mais profunda. Além disso, sugere-se a realização de novos estudos de associação envolvendo genótipos chamados de *high* e *low producers* de *HLA-G*, bem como estudos envolvendo a ligação de microRNAs ao transcrito.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 8th edition, Elsevier Saunders, 2014.
- AKTAŞ, A. **Transplanted kidney function evaluation**. *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 44, n. 2, p. 129–145, 2014.
- ALEGRE, E. et al. **Some basic aspects of HLA-G biology**. *Journal of Immunology Research*, v. 2014, p. 1–10, 2014.
- ALPDOGAN, O.; VAN DEN BRINK, M. R. M. **Immune tolerance and transplantation**. *Seminars in Oncology*, v. 39, n. 6, p. 629–642, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS. **Registro Brasileiro de Transplantes**, n. 2, 2017.
- BAŞTÜRK, B. et al. **Human leukocyte antigen-G, a new parameter in the follow-up of liver transplantation**. *Transplantation Proceedings*, v. 38, n. 2, p. 571–574, 2006.
- BERNARDS, A. et al. **A Class I Antigen, HLA-G, Expressed in Human Trophoblasts**. *Science*, v. 3860, p. 0–3, 1989.
- BHOWMIK, D. M. et al. **The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians**. *Indian Journal of Nephrology*, v. 20, n. 1, p. 2–8, 2010.
- BONILLA, F. A.; OETTGEN, H. C. **Adaptive immunity**. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2, p. S33–S40, 2010.
- BOUKOUACI, W. et al. **Association of HLA-G low expressor genotype with severe acute graft-versus-host disease after sibling bone marrow transplantation**. *Frontiers in Immunology*, v. 2, p. 1–6, 2011.
- CARO-OLEAS, J. L. et al. **Donor-specific antibody detection: Comparison of single antigen assay and Luminex crossmatches**. *Tissue Antigens*, v. 76, n. 5, p. 398–403, 2010.
- CAROSELLA, E. D. et al. **HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects**. *Immunology Today*, v. 21, n. 11, p. 532–534, 2000.
- CAROSELLA, E. D. et al. **Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule**. *Blood*, v. 111, n. 10, p. 4862–4870, 2014.
- CASTELLI, E. C. et al. **In silico analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes**. *Human Immunology*, v. 70, n. 12, p. 1020–1025, 2009.
- CASTELLI, E. C. et al. **The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes**. *Genes and immunity*, v. 11, n. 2, p. 134–141, 2010.
- CASTELLI, E. C. et al. **Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene**. *Journal of Immunology Research*, v. 2014, 2014.

- CASTELLI, E. C. et al. **HLA-G variability and haplotypes detected by massively parallel sequencing procedures in the geographically distinct population samples of Brazil and Cyprus.** *Molecular Immunology*, v. 83, p. 115–126, 2017.
- CATAMO, E. et al. **Comprehensive analysis of polymorphisms in the HLA-G 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus.** *Tissue Antigens*, v. 85, p. 458–465, 2015.
- CHAPLIN, D. D. **Overview of the immune response.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2, p. S3–S23, 2010.
- CHINEN, J.; BUCKLEY, R. H. **Transplantation immunology: Solid organ and bone marrow.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 125, n. 2, p. S324–S335, 1967.
- CHOO, S. Y. **The HLA system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications.** *Yonsei Medical Journal*, v. 48, n. 1, p. 11–23, 2007.
- COLE, E. H. et al. **Impact of acute rejection and new-onset diabetes on long-term transplant graft and patient survival.** *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 3, n. 3, p. 814–821, 2008.
- COURTIN, D. et al. **HLA-G 3' UTR-2 haplotype is associated with Human African trypanosomiasis susceptibility.** *Infection, Genetics and Evolution*, p. 1–7, 2013.
- CRISPIM, J. C. O. et al. **Frequency of insertion/deletion polymorphism in exon 8 of HLA-G and kidney allograft outcome.** *Tissue Antigens*, v. 71, n. 1, p. 35–41, 2008.
- CRISPIM, J. C. O. et al. **Human leukocyte antigen-G expression after kidney transplantation is associated with a reduced incidence of rejection.** *Transplant Immunology*, v. 18, n. 4, p. 361–367, 2008.
- DONADI, E. A. et al. **Implications of the polymorphism of HLA-G on its function , regulation , evolution and disease association.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, n. 68, p. 369–395, 2011.
- EIDELMAN, B. et al. **Neurologic Complications of FK 506.** *Transplant Proceedings*, v. 23, n. 6, p. 3175–3178, 1991.
- FILIPPONE, E. J.; FARBER, J. L. **Humoral Immune Response and Allograft Function in Kidney Transplantation.** *American Journal of Kidney Diseases*, v. 66, n. 2, p. 337–347, 2015.
- FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. **Foxp3 programs the development and function of CD4 + CD25 + regulatory T cells.** *Nature Immunology*, v. 4, n. 4, p. 330–336, 2003.
- FURTADO, G. C. et al. **Interleukin 2 Signaling Is Required for CD4+ Regulatory T Cell Function.** *Journal of Experimental Medicine*, v. 196, n. 6, p. 0–6, 2002.
- GRIESEMER, A. D.; SORENSON, E. C.; HARDY, M. A. **The Role of the Thymus in Tolerance.** *Transplantation*, v. 90, n. 5, p. 465–474, 2010.
- GUAN, Z. et al. **Long non-coding RNA HOTAIR promotes HLA-G expression via inhibiting miR-152 in gastric cancer cells.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2015.

HVIID, T. V. F. et al. **HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels.** Immunogenetics, v. 55, n. 2, p. 63–79, 2003.

ISHITANI, A; GERAGHTY, D. E. **Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 89, n. 9, p. 3947–3951, 1992.

KDIGO TRANSPLANT WORK GROUP. **KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients** American Journal of Transplantation, 2009.

KIM, M. et al. **Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: A review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options.** Pharmacotherapy, v. 34, n. 7, p. 733–744, 2014.

KONVALINKA, A.; TINCKAM, K. **Utility of HLA Antibody Testing in Kidney Transplantation.** Journal of the American Society of Nephrology, v. 26, n. 7, p. 1489–1502, 2015.

LAHIRI, D. K.; NUMBERGER, J. I. **A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies.** Nucleic Acids Research, v. 19, n. 19, p. 5444, 1991.

LAKKIS, F. G.; LECHLER, R. I. **Origin and Biology of the Allogeneic Response.** Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 3, p. 1–11, 2013.

LARSEN, B. Y. C. P.; MORRIS, P. J.; AUSTYN, J. M. **Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens: a novel pathway for initiation of rejection.** Journal of Experimental Medicine, v. 171, p. 307–314, 1990.

LARSEN, M. H.; HVIID, T. V. F. **Human leukocyte antigen-G polymorphism in relation to expression, function, and disease.** Human Immunology, v. 70, n. 12, p. 1026–1034, 2009.

LAZARTE, J. et al. **New Developments in HLA-G in Cardiac Transplantation.** Human Immunology, 2015.

LE ROND, S. et al. **Evidence to support the role of HLA-G5 in allograft acceptance through induction of immunosuppressive/ regulatory T cells.** The Journal of Immunology, v. 176, n. 5, p. 3266–3276, 2006.

LIN, C. M.; GILL, R. G. **Direct and indirect allograft recognition: pathways dictating graft rejection mechanisms.** Current Opinion in Organ Transplantation, v. 33, n. 4, p. 395–401, 2015.

LOUPY, A. et al. **The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology.** American Journal of Transplantation, v. 17, n. 1, p. 28–41, 2017.

LUCENA-SILVA, N. et al. **Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil.** Tissue Antigens, v. 79, n. 4, p. 272–278, 2012.



LUCENA-SILVA, N. et al. **HLA-G 3' Untranslated Region Polymorphisms Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus in 2 Brazilian Populations.** The Journal of Rheumatology, v. 40, n. 7, p. 1104–1113, 2013.

LUQUE, J. et al. **Soluble HLA-G in heart transplantation: their relationship to rejection episodes and immunosuppressive therapy.** Human Immunology, v. 67, p. 257-263, 2006.

MANASTER, I. et al. **MiRNA-mediated control of HLA-G expression and function.** PLoS ONE, v.7, n. 3, p. 1-9, 2012.

MARTELLI-PALOMINO, G. et al. **Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the *HLA-G* gene are associated with differential HLA-G soluble levels in the Brazilian and French population.** PLoS ONE, v. 8, n. 10, p. 1–10, 2013.

MATTOS, A.; OLYAEI, A.; BENNETT, W. **Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future.** American Journal of Kidney Diseases, v. 35, n. 2, p. 333–346, 2000.

MCINTIRE, R. H.; HUNT, J. S. **Antigen presenting cells and HLA-G - A review.** Placenta, v. 26, p. S104-S109, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas: Imunossupressão no Transplante Renal,** 2010.

MISHRA, M. N.; BALIGA, K. V. **Significance of Panel Reactive Antibodies in Patients Requiring Kidney Transplantation.** Saudi Center for Organ Transplantation, v. 24, n. 3, p. 495–499, 2013.

MISRA, M. K. et al. **HLA-G gene expression influenced at allelic level in association with end stage renal disease and acute allograft rejection.** Human Immunology, v. 75, n. 8, p. 833–839, 2014.

MORANDI, F. et al. **Recent advances in our understanding of HLA-G biology: Lessons from a wide spectrum of human diseases.** Journal of Immunology Research, v. 2016, p. 1-14, 2016.

MUELLER, D. L. **Mechanisms maintaining peripheral tolerance.** Nature Immunology, v. 11, n. 1, p. 21–27, 2009.

NAESENS, M.; ANGLICHEAU, D. **Precision Transplant Medicine: Biomarkers to the Rescue.** Journal of the American Society of Nephrology, v.29, p. 1-11, 2017.

NANKIVELL, B. J.; ALEXANDER, S. I. **Rejection of the Kidney Allograft.** New England Journal of Medicine, v. 363, n. 15, p. 1451–1462, 2010.

NEEFJES, J. et al. **Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation.** Nature Reviews Immunology, v. 11, n. 12, p. 823–836, 2011.

OBER, C. et al. **Variation in the HLA-G promoter region influences miscarriage rates.** American Journal of Human Genetics, v. 72, n. 6, p. 1425–1435, 2003.

PADIYAR, A.; AKOUM, F. H.; HRICIK, D. E. **Management of the Kidney Transplant Recipient.** Primary Care - Clinics in Office Practice, v. 35, n. 3, p. 433–450, 2008.

PARKIN, J.; COHEN, B. **An overview of the immune system.** *Lancet*, v. 357, n. 9270, p. 1777–1789, 2001.

PAUL, P. et al. **HLA-G expression in melanoma: A way for tumor cells to escape from immunosurveillance.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 4510–4515, 1998.

PIRRI, A. et al. **A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors.** *Transplant Immunology*, v. 20, n. 3, p. 143–149, 2009.

PORTO, I. O. P. et al. **MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: A new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G.** *Molecular Immunology*, v. 65, n. 2, p. 230–241, 2015.

PRATSCHKE, J. et al. **Immunological risk assessment: The key to individualized immunosuppression after kidney transplantation.** *Transplantation Reviews*, v. 30, n. 2, p. 77–84, 2016.

QIU, J. et al. **Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance.** *American Journal of Transplantation*, v. 6, n. 9, p. 2152–2156, 2006.

RAO, Z. et al. **A lesson from kidney transplantation among identical twins: Case report and literature review.** *Transplant Immunology*, v. 33, n. 1, p. 27–29, 2015.

REBMANN, V. et al. **HLA-G as a tolerogenic molecule in transplantation and pregnancy.** *Journal of Immunology Research*, v. 2014, p. 1-16, 2014.

ROBINSON, J. et al. **The IPD and IMGT/HLA database: Allele variant databases.** *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. D1, p. D423–D431, 2015.

ROUAS-FREISS, N. et al. **The alpha-1 domain of HLA-G1 and HLA-G2 inhibits cytotoxicity induced by natural killer cells : Is HLA-G the public ligand for natural killer cell inhibitory receptors?** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, p. 5249–5254, 1997.

SABBAGH, A. et al. **Worldwide genetic variation at the 3' untranslated region of the HLA-G gene: balancing selection influencing genetic diversity.** *Genes and Immunity*, v. 15, n. 2, p. 95–106, 2014.

SALIFU, M. O.; TEDLA, F.; MARKELL, M. S. **Management of the well renal transplant recipient: Outpatient surveillance and treatment recommendations.** *Seminars in Dialysis*, v. 18, n. 6, p. 520–528, 2005.

SCHOLD, J. D.; SRINIVAS, T. R.; KAPLAN, B. **Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era.** *American Journal of Transplantation*, v. 4, p. 378–383, 2004.

SELIGER, B. **Role of microRNAs on HLA-G expression in human tumors.** *Human Immunology*, v. 77, n. 9, p. 760–763, 2016.

SIS, B. et al. **Banff '09 meeting report: Antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups.** *American Journal of Transplantation*, v. 10, p. 464-471, 2010.

SOLLINGER, H. W. **Mycophenolates in transplantation.** *Clinical Transplantation*, v. 18, n. 5, p. 485–492, 2004.

SUCHIN, E. J. et al. **Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question.** The Journal of Immunology, v. 66, p. 973-981, 2017.

TAYLOR, A. L.; WATSON, C. J. E.; BRADLEY, J. A. **Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy.** Critical Reviews in Oncology/Hematology, v. 56, n. 1, p. 23–46, 2005.

TERASAKI, P. I. **Humoral Theory of Transplantation.** American Journal of transplantation, v. 3, p. 665–673, 2003.

TURECK, L. V et al. **HLA-G 5'-URR SNPs and 3'-UTR 14-bp insertion/deletion polymorphism in an Afro-Brazilian population from Paraná State.** International Journal of Immunogenetics, v. 0, p. 1–5, 2013.

VAN DER VEN, K.; PFEIFFER, K.; SKRABLIN, S. **HLA-G polymorphisms and molecule function - Questions and more questions - A review.** Placenta, v. 21, p. 86–92, 2000.

WARRINGTON, R. et al. **An introduction to immunology and immunopathology.** Allergy, Asthma & Clinical Immunology, v. 7, p. S1-S8, 2011.

YIE, S. M. et al. **A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia.** Molecular Human Reproduction, v. 14, n. 11, p. 649–653, 2008.